



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## Molekulárně genetické markery u myeloproliferativních syndromů

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ](#)

**Autor:** Karolína Matoušová

**Vedoucí práce:** MUDr. Ivan Vonke

České Budějovice 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem **Molekulárně genetické markery u myeloproliferativních syndromů** jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne: 10.8. 2021

-----  
*Podpis*

### **Poděkování**

Tímto způsobem bych ráda poděkovala mému vedoucímu MUDr. Ivanu Vonkemu nejen za trpělivost a čas, který mi věnoval, ale také děkuji za cenné rady a za odborné zkušenosti z klinické praxe, jež mi velmi pomohly. Dále bych chtěla velice poděkovat panu Mgr. Ondřeji Scheinostovi, s jehož pomocí jsem provedla experimentální výzkum k této bakalářské práci.

# Molekulárně genetické markery u myeloproliferativních syndromů

## Abstrakt

Problematika vzniku a vývoje myeloproliferativních onemocnění je to, čím se ve své práci zabývám. Tato skupina chorob je zapříčiněna různými mutacemi na genové úrovni. Práce pojednává o aberacích s nejvyšší frekvencí výskytu, kterými jsou Janusova kináza 2, kalretikulin, MPL a o fúzním onkogenu BCR–ABL v praxi se tyto konkrétní úseky genů využívají jako molekulárně genetické markery při PCR testování.

Hlavním cílem bylo provést mapování míry výskytu již zmiňovaných mutací. Součástí práce je popis celého procesu. Zpracování vzorku včetně popisu použitých molekulárně genetických laboratorních metod. Použitou metodou byla zejména polymerázová řetězová reakce typu ARMS–PCR, kterou se prokazovala přítomnost mutací. Výsledky vyšetření byly získány z počítačového systému genetické laboratoře v Nemocnici v Českých Budějovicích. Soubor obsahoval výsledky vyšetření u 302 pacientů za tříleté období, a to od roku 2017 do roku 2019 plus mnou zpracovaných 27 vzorků během stáže. Data byla seřazena podle výskytu mutace a vložena do tabulek. Následně jsem provedla jejich součet a procentuální výpočet, čímž jsem zjistila jejich dílčí výskyt. Jako další vypovídající hodnotu jsem zjistila medián z celého souboru dat. Na základě statistického vyhodnocení u jednotlivých mutací jsem prokázala nejvyšší procentuální zastoupení mutace genu JAK2. Ta výrazně převyšovala nad mutacemi genů MPL a CALR. Závěrečné hodnoty aberací jsem pro objektivní posouzení porovnála s několika odbornými studii, která byla zaměřena na stejnou problematiku.

Genetická vyšetření jsou dnes u těchto pacientů běžnou záležitostí. Začíná se uvažovat nad takzvaným genetickým profilem pacienta v souvislosti s volbou léčby. Je možné, že na různé typy mutací fungují jiná terapeutika. Byť by se mnohdy mohlo zdát, že jde o totéž onemocnění u několika různých pacientů, právě na základě genetických výsledků se často prokáže jiná aberace nebo další malé přidružené mutace v genomu pacienta, které mohou ovlivňovat vývoj nemoci.

## Klíčová slova

**Myeloproliferativní syndromy; pravá polycytemie; idiopatická myelofibróza; esenciální trombocytémie; mutace JAK2; MPL; CALR; fúzní onkogen BCR–ABL; metoda ARMS–PCR**

# **Molecular genetic markers in myeloproliferative syndromes**

## **Abstract**

The issue of the origin and development of myeloproliferative diseases is what I deal with. This group of diseases is caused by various mutations at the genetic level. The work deals with the aberrations with the highest frequency, which are Janus kinase 2, calreticulin, MPL and the fusion oncogene BCR–ABL.

The main criteria was to map the mutations already mentioned. Part of the work is a description of the process, starting with sample processing, through the collection of biological material, to the description of data from molecular genetic laboratory methods. The method used was mainly polymerase chain reaction of the ARMS–PCR type, which proved the presence of mutations. The results of examinations of patients with a computer system of a genetic laboratory in a hospital in České Budějovice. The files contained the results of examinations of 302 patients over a three-year period, from 2017 to 2019, plus 27 samples processed by me during the internship. As another telling value, I found the median from the whole data set. The data was entered according to the results of the mutation and entered into tables. Subsequently, I proved their sum and percentage calculation, I expected their partial occurrence. Based on the statistical evaluation of individual mutations, I proved the highest percentage of mutations in the JAK2 gene. It significantly exceeded the mutations of the MPL and CALR genes. I am the final values of aberrations for objective assessment by evaluating professional studies, which were focused on insufficient issues. I compared the final values of aberrations with several professional studies that focused on the same issue, for objective assessment.

Genetic testing is a common concern in these patients today. The so-called genetic profile of the patient in connection with the choice of treatment is beginning to be considered. It is possible that different therapeutics work for different types of mutations. Although it may often appear to be the same disease in several different patients, it is precisely the genetic results that often reveal a different aberration.

## **Key words**

**Myeloproliferative syndromes; polycythemia vera; idiopathic myelofibrosis; essential thrombocythemia; mutations JAK2; MPL; CALR; fusion oncogene BCR–ABL; ARMS– PCR method**

# OBSAH

Úvod .....	8
<b>1. Teoretická část .....</b>	<b>9</b>
1.1 Hematoonkologie .....	9
1.2 Myeloproliferativní syndromy (MPS) .....	9
1.3 Molekulárně genetické změny u MPS .....	10
1.3.1 Mutace genu JAK2 .....	10
1.3.2 Mutace MPL genu .....	11
1.3.3 Mutace genu kalretikulinu (CALR) .....	12
1.4 Klasifikace MPS .....	12
1.5 Ph pozitivní myeloproliferativní neoplazie .....	13
1.5.1 Chronická myeloidní leukemie (CML) .....	13
1.6 Ph negativní myeloproliferativní neoplazie .....	16
1.6.1 Polycytémie vera (PV) .....	16
1.6.2 Esenciální trombocytémie (ET) .....	18
1.6.3 Primární myelofibróza (PMF) .....	19
1.7 Preanalytická fáze vyšetření .....	21
1.7.1 Ovlivnitelné faktory .....	21
1.7.2 Neovlivnitelné faktory .....	22
1.7.3 Odběr biologického materiálu .....	22
1.7.4 Transport materiálu .....	22
1.8 Analytická fáze vyšetření .....	23
1.8.1 Cytologické vyšetření .....	23
1.8.2 Histologické vyšetření .....	25
1.8.3 Genetické vyšetření .....	26
<b>2. Cíle práce a hypotéza .....</b>	<b>28</b>
2.1 Cíl práce .....	28
2.2 Výzkumné otázky .....	28
<b>3. Metodika .....</b>	<b>29</b>
3.1 Izolace DNA fenol–chloroformem a purifikace .....	29
3.2 Stanovení mutace v genu JAK2 .....	30
3.2.1 ARMS–PCR .....	30
3.2.2 Detekce PCR produktů pomocí ELFO .....	32
3.2.3 Výsledky .....	33
3.3 Stanovení mutace v genu CALR .....	34
3.3.1 Fluorescenční PCR .....	34

3.3.2	Fragmentační analýza .....	35
3.3.3	Výsledky .....	37
3.4	<i>Stanovení mutace MPL W515K, L</i> .....	38
3.4.1	Real-Time PCR.....	38
3.4.2	Výsledky .....	39
<b>4.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>41</b>
4.1	<i>Charakteristika výzkumného souboru</i> .....	41
4.2	<i>Statistické zpracování výsledků</i> .....	42
4.2.1	Data – rok 2017.....	42
4.2.2	Data – rok 2018.....	43
4.2.3	Data – rok 2019.....	43
4.2.4	Mé výsledky – rok 2021 .....	44
4.2.5	Celkové výsledky.....	45
4.2.6	Porovnání výsledků.....	46
<b>5.</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>58</b>
<b>10.</b>	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>65</b>
<b>11.</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>66</b>

## Úvod

Hematologie je poměrně mladý, neustále se rozvíjející vědní obor. Když se ohlédneme do minulosti, jsou vidět rapidní pokroky, ať už co se týče léčby nejrůznějších chorob, anebo metod pomáhajících určovat diagnózy. Já si vybrala téma právě z tohoto oboru, a sice molekulárně genetické markery u myeloproliferativních syndromů.

Jde o vzácné onemocnění, kterým ročně na území České republiky onemocní 3–4 pacienti na 100000 obyvatel. Z počátku nebývají patrné téměř žádné příznaky. To je velký problém, protože časná diagnostika pacientům výrazně zlepšuje vyhlídky v prognóze. Při podezření na hematologické onemocnění napomáhají k rychlé diagnostice moderní molekulárně biologické metody. Za pomoci těchto vyšetření jsou laboranti schopni odhalit mutace, které mají velký podíl na vzniku onemocnění (Doubek, 2009).

Pod myeloproliferativní syndromy se řadí několik jednotek, které si jsou navzájem podobné. V práci budou zmiňována tři nejrozšířenější, tj. pravá polycytemie, idiopatická myelofibróza a esenciální trombocytémie. V teoretické části se dozvíte veškeré podrobnější informace o těchto onemocněních, jako je indikace k vyšetření, jejich diagnostika a možnosti vyšetření. V praktické části se budu zabývat mapováním výsledků u chromozomálních aberací v průběhu tříročního období, ze kterého vypracuji statistiku. Statistické výsledky vycházející z vyšetření patientských vzorků porovnáám se studiiemi ze spolehlivých literárních zdrojů. Důvodem, proč se problematikou zabývám je návaznost s ohledem na genetický profil pacienta. Nové vědecké objevy, hlavně díky genetice, přináší otázky vedoucí k zamyšlení, zda by genetický profil pacienta neměl mít vliv na volbu léčby. Tímto tématem se zabývá nové odvětví genetiky nazvána farmakogenetika (Adam et al., 2008).



# 1. Teoretická část

## 1.1 Hematoonkologie

Jak z názvu vyplývá, jedná se o obor, který zkoumá krve pacientů s patologickými, lépe řečeno s onkologickými projevy. I přes to, že již existují nejrůznější moderní vyšetření a testy, stále je základem cytologické vyšetření krve a kostní dřeně (KD), případně histologické vyšetření KD (Marinov, 2008).

U pacientů s hematologickými malignitami je cytologické vyšetření krve prvotním kontaktem se zasaženou tkání. V některých případech lze již po provedení těchto základních analýz určit diagnózu. U velké většiny lidí to tak snadné není, ale přinejmenším je možné na základě výsledků vyšetření nasměrovat pacienta dále na specializovaná pracoviště. Vždy je důležité zvážit, která laboratorní vyšetření nechat provést. Specifické analytické metody bývají mnohdy velmi nákladné. Kupříkladu u myeloidní leukemie se jako první provádí cytologický obraz a imunofenotypizace za pomoci průtokové cytometrie. Tato metoda se stala dostupnou díky pokroku v počítačových a laserových technologiích. Hlavní byla implementace nových fluorochromů, které pomohly k vytvoření moderních kompaktních a cenově dostupných průtokových cytometrů. Jejich využití se v našem případě týká imunologické a diferenciální diagnostiky, klasifikace a prognostické stratifikace hematoonkologických chorob, jako je leukemie, myeloproliferace, lymfoproliferace, myelodysplastické syndromy. U našeho typu onemocnění se provádí zejména trepanobiopsie KD a imunohepatologická vyšetření. Další vhodná diagnostická analýza se provádí prostřednictvím cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření. A právě tyto metody jsou časově a finančně náročné. Výsledky z těchto vyšetření se porovnávají se schématem klasifikace světové zdravotnické organizace neboli WHO (Marinov, 2008).

Je to proces několika po sobě jdoucích vyšetření, který může trvat až několik týdnů. Terapii lékaři zahajují již na začátku, kdy ještě není přesně známá diagnóza, protože u těchto nemocí není radno zahálet (Adam et al., 2004).

## 1.2 Myeloproliferativní syndromy (MPS)

Jedná se o skupinu několika diagnostických jednotek, které mezi sebou nemají příliš ostře vymezené hranice. Příčinou onemocnění je neoplastická transformace hematopoetické kmenové buňky, po které následuje nadměrná a nekontrolovatelná

proliferace krevních buněk v KD. Je to klonální onemocnění, kdy prvotní porucha nastává na úrovni kmenové buňky. V hematopoetické buňce se objeví získaná mutace, která způsobí nekontrolovatelnou proliferaci buněčných elementů. Kmenová buňka je základní jednotkou KD a dává za vznik diferencovanějším typům buněk. Tím pádem může jít o proliferaci kterékoli z řad, ať už myeloidní nebo lymfoidní. Její porucha má většinou fatální následky. Přesné faktory, které by mohli být zodpovědné za mutační transformaci, nejsou známy (Campr, 2007).

### 1.3 Molekulárně genetické změny u MPS

Často pozorované chromozomální aberace zahrnují hlavně delece dlouhých ramének chromozomů 20 (20q-) a 13 (13q-) a delece krátkých ramének chromozomu 12 (12p-). Naopak více genetického materiálu je zejména ve formě trisomie chromozomů 8 (+8) a 9 (+9) a částečných duplikací dlouhých ramének chromozomu 1 (1q+). Další změny, které lze pozorovat, jsou takzvané translokace. Zde v hlavní roli vystupuje chromozom 8 s jinými chromozomy, mezi kterými translokace proběhne a vznikají tak různorodé mutace.

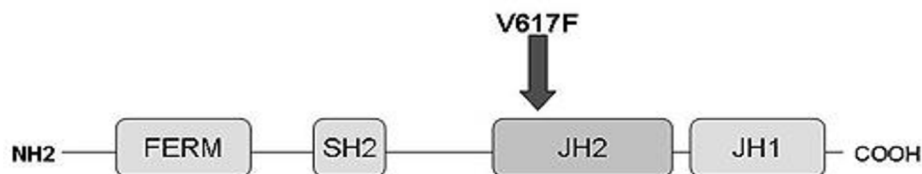
Frekvenční výskyt zmiňovaných mutací je však velmi malý, až na tři z nich, které nad nimi podstatně dominují. Jsou jimi za prvé mutace Janus kináza ( $JAK2^{V617F}$ ), ale i  $JAK2$  v exonu 12, za druhé mutace genu kalretikulinu a poslední je mutace trombopoetického genu (MPL). Zjištění, že jmenované aberace mají přímý vliv na vznik onemocnění, bylo prokázáno díky testům na myších modelech. Dají se na nich též velmi dobře zkoušet účinky a mechanismy působení terapeutických léčiv, jako jsou inhibitory  $JAK2$  nebo interferon  $\alpha$ . (Jarošová et al., 2012).

#### 1.3.1 Mutace genu $JAK2$

V roce 2005 byla poprvé objevena somatická mutace  $JAK2^{V617F}$  kódující protein zvaný Janusova kináza 2, znázorněná viz. Obrázek 1, na kterém je šipkou vyznačeno místo mutace. Zjistilo se, že tato aberace se vyskytuje u 95 % pacientů s pravou polycytémií (PV) a u 50% lidí s pravou myelofibrózou (PMF), nebo esenciální trombocytémií (ET). Podle WHO je považován za důležitý diagnostický marker, ale i při sledování úspěšnosti léčby u těchto typů onemocnění. Ke stanovení diagnózy musíme sledovat více rizikových faktorů, nežli jen přítomnost samotné mutace (Levine et al., 2008; Jarošová et al., 2012).

Gen JAK2 se nachází na chromozomu 9p24 a obsahuje 25 exonů. Jeho produktem je cytoplazmatické JAK tyrozinkináza, což je protein, který zajišťuje přenos signálů indukujících tvorbu krvevorných růstových faktorů. Zkratka vznikla ze slov Janus kináza. Janus podle římského boha Januse, boha dvou tváří. To je příhodné, jelikož obsahuje ve své struktuře dvě symetrické, homologní kinázové domény: katalyticky aktivní doménu JAK homolog (JH1) a téměř totožnou JH2 doménu, která je v mutovaném stavu enzymaticky inertní (Levine et al., 2008).

K mutaci dojde díky takzvané reciproké translokaci. Není známá přesná interakce mezi doménou kinázovou a pseudokinázovou, proto ani struktura mutace doposud nebyla objasněna. V případě vzniku bodové mutace JAK2<sup>V617F</sup> dojde k nahrazení Guaninu za Thimin na pozici 1849 v exonu 14. To má za následek záměnu aminokyseliny valinu za fenylalanin v kodónu 617. JAK2<sup>V617F</sup> mutace následně postihuje doménu JH2, která jak už jsem zmínila, ztrácí svou funkci. Její funkcí bylo záporně regulovat JH1. Finálním dopadem je nekontrolovaná proliferace buněk. Doposud není známo, co stojí za vznikem mutace, ale v některých případech samotná mutace nemusí onemocnění vyvolat, jsou k tomu zapotřebí ještě další vlivy. Další důležitý objev byl, když v roce 2007 přišli na novou mutaci u pacientů s negativitou JAK2V617F s PV, která se nachází v exonu 12 pro JAK2 gen (Morgan et al., 2008; Křístková et al., 2009).



Obrázek 1: Schéma mutace JAK2<sup>V617F</sup>.

Zdroj: Doubek, 2009

### 1.3.2 Mutace MPL genu

Jedná se o somatickou mutaci W515L a W515K v genu MPL, který kóduje c-MPL protein pro trombopoetinový receptor a primární regulátor produkce destiček megakaryocyty. Po stimulaci jeho ligandem indukuje MPL receptor proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněčných linií různého původu. Aberace MPL W515L spočívá v přechodu guaninu na thymin v nukleotidu 1544 vedoucí k následné substituci tryptofanu za leucin na kodónu 515 transmembránové oblasti. Signální dráha receptoru je důležitou součástí růstu a přežití megakaryocytů. Mutace indukuje konstitutivní aktivaci trombopoetického receptoru (TPO) cytokinově nezávislým způsobem, jinými

slovy způsobí aktivaci trombopoetinového receptoru i za nepřítomnosti trombopoetinu. Výskyt aberace byl zjištěn u 5–10% všech pacientů s PMF a 1–4% pacientů s ET (Tefferi et al., 2009).

### **1.3.3 Mutace genu kalretikulinu (CALR)**

Mutace CALR byly objeveny až roku 2013. Aberace má druhé nejvyšší zastoupení v MPS po JAK2V617F. Genetická abnormalita CALR vyřešila molekulární mezeru u pacientů s ET a PMF JAK2 / MPL negativních, což představuje 20–25% z celkových somatických mutací. Zbývající případy (tj. negativní pro JAK2, CALR a MPL) se nazývají „trojnásobně negativní“, což představuje 5–10% všech pacientů s Ph–negativní MPS.

Kalretikulin je hlavní protein nacházející se v lumen endoplazmatického retikula, který se váže s  $Ca^{2+}$  a významně se podílí na zajištění správného složení glykoproteinů, a také přispívá k homeostáze vápníku. Kromě toho CALR ovlivňuje v cytoplazmě, na buněčném povrchu i v extracelulární matrici řadu procesů, jako je proliferace, kontrola kvality bílkovin, apoptózy, fagocytózy a imunitních odpovědí. Nedávno studie týkající se úlohy mutovaných proteinů CALR prokázaly, že jsou schopny se vázat na MPL receptor indukující aktivaci JAK–STAT procesu. Doposud bylo zjištěno přes 50 odlišných variant mutací tohoto genu. Přičemž všechny tyto abnormality se skládají z inzercí, anebo delecí nacházejících se v exonu 9 daného genu (Nangalia et al., 2014).

## **1.4 Klasifikace MPS**

Počáteční klasifikace MPS byla založena na klinických, morfologických a biologických kritériích. Po objevu filadelfského chromozomu (translokace t: 9; 22) a identifikaci fúzního proteinu BCR–ABL byla v roce 2008 vyvinuta nová klasifikace založená na již uvedeném molekulárním markeru. Následně v roce 2016 proběhla poslední revize. Nyní WHO uznává dvě hlavní třídy: a) Ph1–pozitivní, b) Ph1–negativní myeloproliferativní onemocnění. Méně časté poruchy, jako je chronická neutrofilní leukémie a chronická eozinofilní leukémie (hypereosinofilní syndrom), jsou také klasifikovány jako chronické myeloidní poruchy, ale jsou seskupeny samostatně jako atypické MPS (Morgan et al., 2008).

## **Přehled:**

1. BCR/ABL pozitivní/Ph pozitivní:
  - Chronická myeloidní leukémie (CML)
2. BCR/ABL negativní/Ph negativní:
  - Polycytemia vera (PV)
  - Esenciální trombocytémie (ET)
  - Primární myelofibróza (PMF)
  - ostatní (chronická neutrofilní leukémie, chronická eozinofilní leukémie) a neklasifikovatelné

## **1.5 Ph pozitivní myeloproliferativní neoplazie**

### ***1.5.1 Chronická myeloidní leukemie (CML)***

#### **Obecný popis**

Chronická myeloidní leukémie byla poprvé rozpoznána v roce 1845. Je to takzvané klonální nádorové myeloproliferativní onemocnění. Jak naznačuje název, jde o proliferaci buněk myeloidní řady. Vzniká v důsledku reciproké translokace t (9; 22), (q34; q11) pluripotentní kmenové buňky. Reciproká translokace nastává tehdy, když se dva fragmenty oddělí od dvou různých chromozomů a „recipročně“ si zamění své místo na daných chromozomech, v tomto případě se jedná o úlomky dlouhých ramének chromozomů 9(ABL) a 22(BCR). Po takovéto translokaci vznikne fúzní onkogen BCR/ABL. Mutaci se přezdívá Filadelfský chromozóm (Ph1). Danou chromozomální abnormalitu v leukemických buňkách objevili Nowell a Hungerford roku 1960 (Campr et al., 2007; Pecka et al., 2006).

Přišlo se na to, že u většiny nemocných je v nádorových buňkách přítomen Filadelfský chromozóm a u ostatních byla lokalizována pouze přítomnost fúzního genu BCR/ABL, který se na této mutaci podílí. CML je schopna expanze v různých liniích krvetvorby (myeloidní, lymfoidní linie) a může zahrnovat monocytární, erytroidní, megakaryocytární, B–lymfoidní a příležitostně T–lymfocytární linie, i když nárůst bývá převážně v granulocytární myeloidní řadě (Žáčková, 2012).

#### **Projevy**

Prvotními projevy jsou nespecifické bolesti kostí a kloubů. Připisováno je to hypercelulární kostní dřeni, kde se hromadí leukemické klony. Po čase začínají cirkulovat i v krvi periferní a usazují se v orgánech jako je slezina a játra. Tím dochází

ke zvětšení orgánů. Hlavně ke splenomegálii, což je velmi častý nález u pacientů s CML. Zvětšené orgány tlačí na okolní tkáň, takže pacient může opět pociťovat bolest v podžebří. Pacienti dále pociťují žaludeční nevolnost, pocit plnosti i po malé porci jídla.

V pokročilejší fázi díky vysokému počtu leukemických buněk dochází k útlaku dozrávání jiných potřebných krvinek, jako jsou erytrocyty, jejichž funkcí je okysličovat tkáň. Tím pádem nastává hypoxie v okrajových tkáních. Také trombocyty jsou v menším počtu, než by měly být, tudíž je zvýšené riziko krvácení.

Snížení počtu erytrocytů, tzv. chudokrevnost nebo jinak také anémie s sebou nese další nepříjemnosti. Pacient je bledý, rychle se unaví, nezvládá větší zátěž, má dechové potíže, nemůže spát, trpí bolestmi hlavy a závratěmi. Vzácně může být postižena i centrální nervová soustava, což se projeví jako bolest hlavy, závrať, zmatenost, porucha vědomí, křeče, zvracení apod. opět je to způsobeno útlakem červených krvinek leukocyty. Dalším orgánem, který je bílými krvinkami postižen, jsou plíce. Projevem je dušnost (Souček, 2011).

### **Fáze onemocnění**

Onemocnění má několik fází, které jsou znázorněny na Obrázku 2. Asi 95% pacientů je diagnostikována v chronickém stádiu, které může trvat měsíce až roky. Fáze postupuje pomalu, pacienti mohou být zcela bez příznaků či s lehkými příznaky. Pacienti jsou v této fázi choroby schopni běžných životních aktivit bez většího omezení. Zvýšený počet leukocytů je prozatím snadno ovlivnitelný léčbou. V krvi převažují zralejší buňky s částečně zachovávanou funkcí a blasty představují jen malou část z nich (Žáčková, 2012).

Akcelerovaná fáze je obdobím zvýšené aktivity onemocnění, trvající několik měsíců. Nyní se již projevují charakteristické příznaky, jako bolest kostí, zvýšená teplota, noční pocení, úbytku na váze, zvětšování se sleziny, únava, krvácivé projevy atd. Choroba přestává reagovat na dosavadní terapii. Pacient již není schopen vykonávat běžné aktivity. Počet bílých krvinek se zvyšuje a s nimi i procento blastů. Počty krevních destiček buď stoupají nebo naopak klesají (Žáčková, 2012).

Fáze blastického zvratu se může rozvinout z fáze akcelerované, ale může vzniknout i náhle z chronické fáze bez jakéhokoli varování. Tato fáze se velmi podobá akutní myeloidní leukémii (Žáčková, 2012).

<b>Chronická fáze (CP)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Blastů &lt; 15 % v KD nebo PK</li> <li>▪ Blastů + promyelocytů ≤ 30 % v KD nebo PK</li> <li>▪ Bazofilů ≤ 20 % v PK</li> <li>▪ Trombocytů ≥ 100 x 10<sup>9</sup>/l</li> </ul>
<b>Akcelerovaná fáze (AP)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Blastů 15 %–29 % v KD nebo PK</li> <li>▪ Blastů + promyelocytů &gt; 30 % v KD nebo PK</li> <li>▪ Bazofilů &gt; 20 % v PK</li> <li>▪ Perzistující trombocytopenie (&lt;100 x 10<sup>9</sup>/l) nezpůsobená léčbou</li> </ul>
<b>Blastická krize (BC)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Blastů ≥ 30 % v KD nebo PK</li> <li>▪ Extramedulární blastická infiltrace</li> </ul>

Obrázek 2: Charakteristické rysy fází CML.

Zdroj: Žáčková, 2012

### Diagnostické parametry, krevní obraz + diferenciální rozpočet leukocytů

Výše zmíněné příznaky nejsou dostatečné pro diagnostiku chronické myeloidní leukémie. Až na základě provedeného vyšetření KO a diferenciálního rozpočtu leukocytů lze konstatovat podezření na CML. Nález zvýšeného počtu leukocytů, tzv. leukocytóza 20–500 x 10<sup>9</sup>/l, kdy referenční hodnota je v rozmezí 4–9 x 10<sup>9</sup>/l, je jasným signálem leukémie. Méně častá je trombocytopenie neboli snížený počet krevních destiček. Červené krvinky jsou buď v normě, anebo je jejich počet snížen. V diferenciálním rozpočtu leukocytů je takzvaný posun doleva, kdy jsou přítomny i mladší formy buněk jako například promyelocyty, myelocyty a metamyelocyty. Blasty s rozvojem onemocnění přibývají. Může se také objevit nárůst eozinofilů a bazofilů (Žáčková, 2012).

### Léčba

Dříve byl obecně přijímán, jako vhodný prostředek k léčbě CML, u pacientů v chronické fázi interferon alfa. Zejména pro ty, kteří nebyli způsobilí pro alogenní transplantaci kmenových buněk. Lék může vyvolat mnoho vedlejších účinků, ale na druhou stranu až u 1/3 pacientů vyvolával téměř úplné nebo úplné cytogenetické reakce a pravděpodobně prodlužuje přežití (Faber et al., 2010).

Později došlo k vynalezení TKI= tyrozinkinázových inhibitorů, což jsou zjednodušeně nízkomolekulární látky způsobující inhibici proliferace. Prvním z nich byl imatinib. Proběhly studie v rocích 2002–2008, které potvrdily jeho účinek při trvalém

užívání v 60% případů. dnes už existují jiné jemu podobné s cílenou buněčnou inhibicí (Faber et al., 2010).

Chtěla bych vyzdvihnout už jednou zmíněnou alogenní transplantace kmenových buněk (HSCT) od zdravého dárce. V některých případech vede k vyléčení jedince v chronické fázi myeloidní leukémie. Terapie má za cíl eliminaci všech maligních buněk dárčovskými aloreaktivními imunokompetentními buňkami. Tato léčba není vhodná pro každého, je spíše pro pacienty s těžkým průběhem, kteří neodpovídají na jinou léčbu. Potíž je také v nalezení vhodného dárce (Or, 2003).

## **1.6 Ph negativní myeloproliferativní neoplazie**

### **1.6.1 Polycytémie vera (PV)**

#### **Obecný popis**

Česky také nazývána pravou polycytémií. Je známá již z počátku 20. století, kdy byla poprvé popsána Williamem Oslerem. Incidence tohoto onemocnění je 1–2/100 000 obyvatel ročně. Je to nemoc objevující se u lidí spíše staršího věku nad 60 let. Opět hovoříme o myeloproliferativním onemocněním zapříčiněným genovou transformací kmenové buňky kostní dřeně. I zde hraje zásadní roli získaná mutace genu JAK2, která se nachází v 90–95% případů. Lidé s tímto onemocněním se dožívají 15–20 let (Chlobák, 2005).

Polycytémie se vyznačuje zvýšenou produkcí hlavně erytrocytární řady a v malé míře i buněk dalších řad. Ery se množí, protože je narušena regulace jejich produkce a také díky zvýšené citlivosti erytroidní prekurzorů (BFU–E) na erythropoetin (EPO). Hladina EPO ale není zvýšená, jako tomu je například u reaktivní polyglobulie. Tím se dají tyto dvě onemocnění rozlišit. Takže čím větší množství červených krvinek se v krevním oběhu vyskytuje, tím je poměr tekutiny ke krevním elementům menší a krev je více vazká. Krvinky tekutinu doslova utlačují. Příliš hustá krev hůře protéká cévním systémem a způsobuje oběhové problémy (Doubek, 2009).

Choroba se může zvrhnout buď do blastické formy, nebo přejde do postpolycytemické myelofibrózy. PV se nedá zcela vyléčit, ale při dobré péči není dožití vysokého věku výjimkou (Schwarzl et al., 2011).

#### **Projevy**

Jak už jsem zmínila, zmnožení erytromasy způsobuje hustou krev, a to následně u pacientů vyvolává bolest hlavy, závratě, zrakové poruchy, zvýšené riziko trombózy,



embolií a srdečního infarktu. Dále lidé s PV mohou pociťovat svědění po celém těle hlavně po koupeli, bolestivé poruchy mikrocirkulace krve na rukou a nohou nebo hypertenzi či krvácení z nosu, ale i tzv. ušní šelest (Dulíček, 2018).

### **Diagnostické parametry, krevní obraz + diferenciální rozpočet leukocytů**

U pravé polycytemie jsou kritéria pro diagnostiku určována podle hladin hemoglobinu a přítomnosti JAK2 mutace. Také se lze přibližně orientovat i podle hladiny EPO, kde bychom očekávali, že se bude hladina zvyšovat společně s hladinou ery, ale není tomu tak. Ba dokonce může být koncentrace snížena. U hemoglobinu (Hb) hovoříme o hladině Hb > 185 g/l pro muže a u žen o Hb > 165 g/l, nebo také nižší hodnoty, pokud oproti normálu vzrostly alespoň o 20 g/l, ale nebylo to způsobeno kompenzací deficitu železa. V krevním obraze často nalézáme větší množství retikulocytů a v diferenciálním rozpočtu leukocytů jsou zvýšeny převážně neutrofily, a to až na hodnoty 10–12 x 10<sup>9</sup>/l (Schwarzl et al., 2011).

Zvýšená hladina hemoglobinu v krvi a nálezu bodové mutace JAK2 nám prokazuje, že pacient trpí tímto onemocněním. Nález mutace však nevylučuje, že se nemůže jednat o jinou chorobu s ní spojenou například o reaktivní erytrocytózu nebo myelofibrózu či sekundární polycytémii. V nízkém procentu však mohou být nemocní s variantou JAK2 negativní v exonu 12. Potom se pátrá po jiných mutacích v tomtéž exonu. Dalším důležitým charakteristickým znakem pro PV je splenomegalie někdy i hepatomegalie (Schwarzl et al., 2011).

### **Léčba**

Pro polycytémii doposud neexistují žádné prostředky, které by měly schopnost vyléčit toto onemocnění. Lékaři se alespoň snaží zmírnit příznaky a zpomalit progresi choroby. Na odstraňování nadbytečného množství erytrocytů (cytoredukce) se provádí flebotomie takzvané pouštění žilou, které ulevuje od celkové bolesti těla a také snižuje trombotické příhody. Kyselina acetylsalicylová napomáhá proti srážení krve (agregaci) krevních destiček, ale není schopna snižovat jejich počet. Hydroxyurea je vhodná pro starší pacienty jako nespecifická cytoredukce. Na opak léčba interferonem alfa je vhodná spíše pro pacienty mladšího věku, jelikož u nich spíše snižuje počet leukemických buněk. Samozřejmě po objevení JAK2 inhibitorů, byla zjištěna větší účinnost s cílem modifikovat průběh nemoci (Dulíček, 2018).

## ***1.6.2 Esenciální trombocytémie (ET)***

### **Obecný popis**

Další hematologické onemocnění ze skupiny MPS je esenciální, nebo také primární trombocytémie. Znovu chci připomenout, že se jedná o klonální myeloproliferativní poruchu kmenové buňky (Adam et al., 2001). Je příhodně pojmenováno podle velkého nárůstu trombocytů v krvi, respektive zralých megakaryocytů, ze kterých se odlamují elementy nazývající se krevní destičky (trombocyty). Takže vznikne stav megakaryocytární hyperplázie s následnou trombocytózou udržovanou v periferní krvi, což podporuje výskyt trombohemoragických jevů. Označení primární znamená, že se jedná o postižení přímo trombocytů a jejich proliferaci. Když by naopak koncentrace trombocytů byla vyšší z důvodu jiné nemoci jednalo by se o takzvanou sekundární trombocytémie. Trombocyty se podílejí na zástavě krvácení, když je jich málo, tak je příznakem prodloužená krvácivost. Pokud je jich nadměrné množství, tak se díky jejich adhezivní schopnosti snáze tvoří tromby, které mohou ucpávat cévy (Doubek, 2009; Schwarzl et al., 2011).

Statisticky vzato se u poloviny pacientů vyskytuje mutace JAK2<sup>617V/F</sup>. V přítomnosti této mutace je zvýšené riziko výskytu faktorů, jako je tromboembolické komplikace nebo závažné krvácení, počet trombocytů vyšší než 1.000.000/ $\mu$ l včetně zmíněné. Naopak u mutace genu kalretikulinu je riziko nižší. Co se týče klinického progresu onemocnění nekomplikované formy ET, mohou pacienti po odhalení tohoto onemocnění a zároveň s vhodnou léčbou dožít až 15 let. Někdy však onemocnění může přecházet do myelofibrózy, pak je jejich prognóza horší (Červinek et al., 2014; Grinfeld et al., 2018).

### **Projevy**

U esenciální trombocytémie nebývají žádné časné příznaky nebo symptomy. Pacienti mívají zvětšenou slezinu, ale není zvětšená natolik, aby se dala zjistit palpačně. Splenomegalie se však dá vyšetřit sonograficky. V polovině případů u nemocných bývají trombotické projevy a také krvácivé komplikace v závislosti na počtu trombocytů. Krvácení postihuje zejména sliznice GIT a horních cest dýchacích. Často se vyskytují trombózy velkých cév, zejména ledvinných a jaterních žil. Poruchy nedostatečnosti v prokrvování konečků prstů jak na rukách, tak na nohách, výjimečně může dojít dokonce k rozvoji gangrény nebo k parestéziím (poruchám cití) kvůli brnění, anebo mravenčení.

Následně pak může dojít až k poškození nervových zakončení v těchto oblastech (Doubek, 2009).

### **Diagnostické parametry, krevní obraz + diferenciální rozpočet leukocytů**

Určení diagnózy závisí na počtu trombocytů, který by měl být  $> 400 \times 10^9/l$ . Běžná hladina trombocytů se pohybuje v rozmezí  $150\text{--}400 \times 10^9/l$ . Dále je podstatný pozitivní výsledek JAK2 či mutace genu kalretikulinu.

Krevní obraz nám v tomto případě příliš neřekne, a proto se pokračuje s dalším vyšetřením. U pacientů s podezřením na esenciální trombocytémii je nutné provádět vyšetření kostní dřeně zvané trepanobiopsie. Pomůže nám odlišit ET od jiných onemocnění krve, jako jsou chronické zánětlivé procesy, nedostatek železa, stav po operaci sleziny, zhoubné nemoci, stav po velkém krvácení, ale i od jiných myeloproliferací (Penka et al., 2005).

### **Léčba**

V mnohých případech nebývá stav natolik závažný, aby ho bylo nutno léčit. Pacient je tedy pouze sledován, pokud je však indikována léčba, jsou dvě možnosti volby. Buď lze pacientovi podávat lék s tromboreduktivním účinkem, anebo podávat antiagregační léčiva (Penka et al., 2005).

### **1.6.3 Primární myelofibróza (PMF)**

#### **Obecný popis**

Na rozdíl od případu PV je užitečnost screeningu mutace JAK2<sup>617VF</sup> pro diagnózu PMF omezena pomocí optimálního negativního prediktivního stavu a nedostatku diagnostických specifíků v kontextu myeloidu. V 50% případů se vyskytuje mutace Jánus Kinázy, z menší části se pak objevuje mutační změna genů MPL a CALR. Lidé s tímto onemocněním se dožívají pouze 3 maximálně 5 let, a to kvůli nedostatečné krve tvorbě. Statisticky se nemoc objevuje u lidí nad 50 let a častěji u mužů (Tefferi et al., 2007).

V prvopočátku podle krevního obrazu se zdá, jako by šlo o ET, ale při dlouhodobém sledování pacienta a prokázání přítomnosti vaziva lze nemoc od sebe odlišit. Jelikož postupem času, jak se nemoc vyvíjí, dochází k vazivové přestavbě (fibróze) kostní dřeně (myel) a z těchto dvou latinských slov vznikl název myelofibróza. Do nedávna se v názvu používalo přídavné jméno idiopatická, jelikož původ vzniku nemoci byl neznámý. Nyní se již používá název primární myelofibróza. Pokud je však vzniklé vazivo následkem jiné choroby, jde o sekundární myelofibrózu. Ta postihuje například pacienty s pravou polycytémií, chronickou myeloidní leukémií, akutní myeloidní leukémií,

myelodysplastickým syndromem, vlasatou buněčnou leukémií a dalšími lymfoproliferativními nemocemi. V tomto případě k tomu opět dochází po mutaci kmenové buňky, která vede nejprve ke zvýšené produkci krevních destiček, červených a bílých krvinek. Destičky se odlupují za pomoci cytokinů z megakaryocytů. A právě cytokiny způsobují tvorbu vaziva v kostní dřeni. Časem je krvetvorná tkáň zaplňována vazivovými buňkami. Ty utlačují ostatní buňky a jejich další tvorbu, takže vzniká jak anémie, trombocytopenie, tak leukopenie. Tělo se s tím snaží vypořádat tak, že krvetvorbu přesune do jater a sleziny. Proto mají nemocní slezinu zvětšenou. Problémem je, že tyto orgány nedokážou plně nahradit krvetvorbu kostní dřeni a časem se to projeví na úbytku krvinek (Brychtová, 2007).

### **Projevy**

Většina pacientů nemá při diagnóze žádné obtíže a jde o náhodný nález abnormalit krevního obrazu. Klinické příznaky nemoci jsou obvykle způsobeny až zvětšující se slezinou, která může zasahovat až do malé pánve a způsobovat bolesti břicha, levého ramene nebo zažívací obtíže. Během onemocnění se mohou zvětšovat játra. Častým projevem bývá únava, která je dána především nedostatkem červených krvinek, ale také se na ní podílí zvýšená aktivita kostní dřeni v počátku onemocnění a zvýšený počet bílých krvinek. Z důvodu poruchy funkce destiček a jejich zvýšeného počtu na počátku nemoci je možným příznakem nemoci vznik trombózy (krevní sraženiny) v oblasti břicha, mozku, srdce, končetiny. Možným projevem nemoci je také krvácení, které je způsobeno poruchou funkce destiček, nebo jejich nízkým počtem. Často vznikne trombóza v oblasti portální žíly, nebo jaterních žil a u pacientů dochází k rozvoji portální hypertenze s bolestmi břicha, zvětšování jater, krvácením z jícnových varixů (kompenzativní rozšiřování cév v oblasti žaludku a jícnu). Komplikací nemoci v pozdním stadiu je přechod nemoci do akutní leukémie (5–10%), infiltrace kůže či jiných tkání buňkami kostní dřeni (Brychtová, 2007).

### **Diagnostické parametry, krevní obraz + diferenciální rozpočet leukocytů**

Mezi prvními se provádí sonografické vyšetření jater a sleziny nejen k posouzení jejich velikosti, ale také posouzení struktury a vyloučení jiného typu nádorové nemoci. Další vyšetření probíhá následujícím způsobem. Nejprve se udělá mikroskopické vyšetření nátěru periferní krve, kde nacházíme nezralé bílé a červené krvinky. Erytrocyty jsou také o poznání větší než normálně s neobvyklými tvary a mají kratší životnost. I krevní destičky mohou být zvětšené. Stav ery se potvrdí molekulárně–biologickým vyšetřením, kdy vyšší rozpad červených buněk má za následek vyšší hladinu kyseliny

močové z bilirubinu. Následně je zásadní provést vyšetření KD cytologicky, histologicky, cytogeneticky, imunofenotypicky a molekulárně geneticky. Ze získaných výsledků dostaneme informace o krvetvorbě, podílu vaziva v KD, vyloučí se tím i možnost jiného onemocnění, která způsobují fibrózu dřeně (Indrák et al., 2014).

## **Léčba**

Terapie primární fibrózy závisí na mnoha faktorech. Zejména na samotném stavu a pokročilosti onemocnění pacienta. Dříve se často používala chemoterapeutika, imunomodulační léčiva nebo různé modifikátory biologické odezvy, které nebyly vždy zaměřeny na biologické procesy, které jsou základem vzniku PMF. Takové strategie jsou paliativní a mají nejistý vliv na přežití. V současnosti je jednou z možností alogenní transplantace kmenových buněk (ASCT). Je to sice dobrý prostředek ke změně přirozené anamnézy pacientů s PMF, ale je tu vysoké riziko morbidity a mortality spojené s transplantací. Existuje však ještě jedna možnost, která byla vyvinuta následně po objevení JAK2 mutace. Jsou jimi selektivní JAK inhibitory (Indrák et al., 2014; Červinek et al., 2014).

## **1.7 Preanalytická fáze vyšetření**

U každého odběru je důležitá již fáze preanalytická, která zahrnuje veškeré úkony před samotnou analýzou, tj. přípravu pacienta před odběrem, odběr krve, uchování a transport vzorku, přípravu vzorku před analýzou. Takovýto soubor postupů a operací je velmi důležitý a jeho nedodržení má za následek interference v měření. Proto se zdravotní pracovníci snaží o co nejlepší poučení pacienta o několika nezbytných zásadách, které by měl dodržet (Bunešová et al., 2008).

### **1.7.1 Ovlivnitelné faktory**

Jedním z nich je dodržení fyzického klidu 24–48 hodin před odběrem a 30 min. přímo před odběrem. Po namáhavém cvičení dochází ke snížení hladiny glukózy, cholesterolu, triacylglycerolů, také to vede ke zvýšení celkové bílkoviny, hemoglobinu a hodnot hematokritu, myoglobinu, kreatinu, AST, LD. Při nadměrné zátěži se zvyšují i hodnoty laktátu a močoviny. Dále psychický stres, který zvyšuje vyplavování adrenalinu, noradrenalinu, kortizolu, což vede například k hyperglykémii, vzestupu volných mastných kyselin. Je potřeba dodržet běžný pitný režim spíše neslazených nápojů. Co se týče stravy snažit se vynechat den předem tučná jídla s tím, že se pacient

nají naposledy večer před odběrem, tak aby zde byla prodleva cca 10–12 hodin lačnit. Pozor, déle se nedoporučuje! U dětí do 6 let je tento požadavek tolerantnější, lze požit suchý rohlík minimálně 2 hodiny před odběrem, u kojených dětí poslední kojení alespoň 2 hodiny před odběrem. Pacient tedy přijde ráno nalačno k odběru, předtím by měl přijmout tekutiny ve formě čisté vody, rozhodně ne kávu, alkohol, slazené a energetické nápoje. Požití potravy by mělo za následek zvýšení koncentrace glukózy, železa, lipidů, vyplavení hormonů, pokles draslíku, fosfátů a chloridů, dochází k vzestupu močoviny a kyseliny močové v séru, poklesu fosforu. Požití tuků způsobí chylózní sérum nebo plazmu. Při dehydrataci je zhoršen nebo i znemožněn vlastní odběr a výsledky laboratorních odběrů mohou být výrazně zkresleny, jelikož je krev zahuštěna. Drogy a léky mají silný vliv na metabolické procesy. Pokud je to možné doporučuje se léky vysadit, pokud ne (např. warfarin), musí se udělat poznámka o jejich užívání na žádanku, stejně tak dostal-li pacient před odběrem infuzi, transfuzi, mraženou plazmu, nebo je-li léčen cytostatiky atd. Dalšími neméně důležitými faktory jsou hmotnost, životní styl, kouření, zevní prostředí (Bunešová et al., 2008).

### **1.7.2 Neovlivnitelné faktory**

Do této kategorie řadíme pohlaví, etnický původ, věk, gravidita, cirkadiální rytmy pacienta.

### **1.7.3 Odběr biologického materiálu**

Odběr krve je proveden následovně. Pacient je vsedě nebo leže. Místem v pichu obvykle bývá loketní jamka. Místo je řádně dezinfikováno, po napíchnutí se odebírá plné žilní krve nejlépe 10ml do označené zkumavky štítkem s údaji pacienta. Zkumavka obsahuje antikoagulační činidlo, kterým většinou je K3EDTA. Nesražená krev musí být proto, aby vůbec šlo vyšetření provést. K3EDTA má vlastnosti chelatačního činidla, a to díky obsahu draselných solí kyseliny etylendiaminotetraoctové. To znamená, že dokáže vychytávat ionty jako třeba  $\text{Ca}^{2+}$  z krve a tím zabrání vzniku koagula (Loosová et al., 2018; Bunešová et al., 2008).

### **1.7.4 Transport materiálu**

Neprodleně po odběru by měl být vzorek odeslán společně s žádankou do laboratoře. Při transportu se udržuje v konstantní teplotě v rozmezí 15–25 °C. V laboratoři na příjmu se zkontrolují údaje na žádance s údaji na zkumavce. Dále se přiřadí čárový kód skrze

počítačový systém pro každého pacienta originální. Kód se nalepí jak na zkumavku, tak i na žádanku, aby byla možnost zpětného dohledání. Takovýto vzorek putuje do další sekce laboratoře, kde se nechá několik minut na rolovací třepačce, která ji neustále promíchává. Následně, je vzorek vložen do automatického analyzátoru a jeho součástí bývá i diferenciální rozpočet bílých krvinek. Některé hodnoty KO jsou určeny přímo analyzátořem, jiné musí být dopočítány laborantkou (Roučková, 2018).

## **1.8 Analytická fáze vyšetření**

Pro zjištění přesné diagnózy musí pacient podstoupit celou řadu odběrů a vyšetření. V následující kapitole jsou představeny ty nejzákladnější, ale k prokázání MPS je zásadní genetické vyšetření a vyhodnocení přítomnosti nebo nepřítomnosti mutací, na které jsem se v práci zaměřena (viz. metodika práce).

### **1.8.1 Cytologické vyšetření**

#### **Krevní obraz**

Krevní obraz se běžně označuje zkratkou KO a je vůbec nejzákladnějším vyšetřením krve v hematologických laboratořích. Poskytuje kvantitativní informace o buňkách červené a bílé krevní řady. Nezjišťuje se však pouze počet červených krvinek (erytrocytů), počet bílých krvinek (leukocytů), ale i počet krevních destiček (trombocytů) a také koncentrace červeného krevního barviva (hemoglobinu), hematokrit, střední objem erytrocytu (MCV), střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH), střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC) a šíře distribuce erytrocytů (RDW), což je parametr ukazující na stejnou nebo rozdílnou velikost erytrocytů. Zkratky uvedené v závorkách jsou jednotně zavedené a používané v laboratořích (Roučková, 2018).

#### **Diferenciální rozpočet leukocytů**

Jde o vyšetření, které má za cíl vytvořit rozpočet podtypů bílých krvinek na základě jejich morfologických odlišností. Leukocyty se primárně dělí na dvě hlavní skupiny granulocyty (polymorfonukleáry) a agranulocyty, kam se řadí různé typy lymfocytů, monocytů, plazmatické a NK buňky (mononukleáry). Do granulocytární populace patří neutrofilní, eosinofilní a basofilní segment. Jejich názvy jsou odvozeny od typu granulí, které v sobě nosí. Vyšetření se provádí z periferní krve, ze které se udělá tenký nátěr na sklíčko. Nátěr se obarví pomocí panoptického barvení dle Pappenheima s použitím barviv May Grünwald a Giemsa Romanowsky. Díky tomu získáme přehled o

tom, zda je počet některého typu leukocytů zvýšen nebo snížen, zda nejsou přítomny abnormální anebo nezralé buňky. Bílé krvinky totiž hrají významnou roli v boji proti nejrůznějším patogenům. Určité patofyziologické nálezy korespondují s některými typy onemocnění (Mescher, 2018).

### **Průtoková cytometrie**

Jedná se o přímou imunofluorescenční metodu, kterou využíváme ke stanovení jak krevního obrazu, tak i diferenciálu leukocytů, ale i jiných částic. Průtokový cytometr je sofistikovaný přístroj měřící více fyzikálních charakteristik jediné buňky, jako je velikost a granularita současně. Jeho působení závisí na vlastnostech zkoumaných buněk rozptylujících světlo, které mohou být odvozeny z barviv nebo monoklonálních protilátek zaměřených buď na extracelulární molekuly umístěné na povrchu, nebo na intracelulární molekuly uvnitř buňky. Díky tomuto přístupu je průtoková cytometrie výkonným nástrojem pro podrobnou analýzu složitých populací v krátkém časovém období (Adan et al., 2017).

Metoda umožňuje měření a analýzu fyzikálně chemických vlastností buňky a jiných biologických částic během průchodu laserovým paprskem. Je nezbytné, aby buňky byly ve formě suspenze a tím mohly procházet systémem jako korálky na niti jedna za druhou konstantní rychlostí. Ve chvíli, kdy buňka tento paprsek protne, dojde k lomu a rozptylu světla. Vše tedy závisí na směru a úhlu lomu. Rozlišujeme přímý rozptyl – forward scatter (FSC) a boční rozptyl – side scatter (SSC). FSC udává velikost buňky a je charakterizován lomem světla o úhlu 2°–13°. Úhel SSC je 90° a je způsoben vnitřní buněčnou granularitou. Kromě lomu a rozptylu světla je detekována také fluorescence procházejících buněk nebo částic. Abychom mohli rozlišit jednotlivé subpopulace leukocytů, musíme buňky označit monoklonálními protilátkami proti specifickým CD znakům značené fluorescenčním barvivem (Adan et al., 2017).

### **Významné povrchové znaky leukocytů:**

CD3+ zralé T lymfocyty	CD16+, CD56+ NK buňky (5–15%)
CD4+ subpopulace Th lymfocytů (30–60%)	CD14+ buňky: monocyty
CD8+ subpopulace Tc lymfocytů (15–30%)	CD15+ buňky: granulocyty
CD25+ aktivované T lymfocyty (1–5%)	CD38+ buňky: plazmatické buňky
CD19+ zralé B lymfocyty (5–15%)	

Fluorochromy absorbují světlo o určité vlnové délce vyzařované laserem a následně emitují část absorbovaného světla již o jiné vlnové délce. Jev je nazýván Stokesův posun



a je definován jako rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou. Průtokové cytometry jsou dvou nebo troj laserové. V analyzátoru je vzorek ozářen monochromatickým zářením nejčastěji se využívá argonový laser o excitační vlnové délce 488 nm (modrá oblast spektra), helium-neonový laser s vlnovou délkou 633 nm (červená oblast spektra) a fialový laser s vlnovou délkou 407 nm nebo UV laser s vlnovou délkou 350 nm. Signály z optické části přístroje jsou převedeny na elektrické impulsy, které jsou zpracovány počítačovým programem. Výsledek je pak vyjádřen graficky buď v histogramu, nebo v dot plotu, kde můžeme pozorovat přímý rozptyl (FSC), boční rozptyl (SSC) a zároveň fluorescenci. V grafu je každá buňka reprezentována jednou tečkou a při vhodném nastavení je vizuální rozlišení buněčných populací velmi dobré (Šinkorová et al., 2008; Harway et al., 2005).

Hodnocení výsledných grafů provádí kvalifikovaný zdravotní laborant. Nejprve se pohlíží na celkové počty leukocytů, které jsou složeny z lymfocytů, monocytů a NK či NKT buněk a granulocytů uvedené v relativních hodnotách. V dalších grafech, které jsou ještě rozdělené na gaty, se nacházejí buňky rozdělené podle pozitivivity cd znaků. Osa X znázorňuje například znak CD3+ a osa Y CD4+. V gatu, kde se kříží osa X s osou Y, se nachází buňky CD3+ a CD4+, což víme, že jsou Th-lymfocyty. Jsou zde uvedena čísla v procentech. Hodnotíme tedy, zda všechny výsledky jsou v mezích referenčních hodnot a zároveň hlídáme imunoregulační index (IRI). IRI je poměr CD4/CD8 lymfocytů, který by měl být za fyziologického stavu roven dvěma. Z toho vyplývá, že počet Th-lymfocytů (pomocné) má být přibližně dvakrát větší než počet Tc-lymfocytů (cytotoxické). Po součtu všech procentuálních čísel každé populace bychom měli dostat 100%. Díky vyhodnocení celkové populace bílých krvinek získáme náhled a předběžný diagnostický směr. Kupříkladu když je velmi zvýšený počet B-lymfocytů jde o B lymfoproliferaci, jaká se vyskytuje u onemocnění B-CLL (CLL = chronická lymfoidní leukémie), nebo naopak téměř chybí B-ly, to indikuje Brutonovu agamaglobulinémii. Zkrátka jedná se o dokonalého rádce v diagnostice v hematologické laboratoři (Hořejší et al., 2017; Šinkorová et al., 2008).

### **1.8.2 Histologické vyšetření**

#### **Trepanobiopsie kostní dřeně**

Vyšetření je důležitým diagnostickým nástrojem pro rozlišení specifických podtypů MPS. Jedná se o odběr kostní dřeně speciální dutou jehlou (Jamshidiho jehlou). Právě to může být pro stanovení diagnózy případného hematologického onemocnění velmi

důležité. Trepanobiopsie je podobná aspiraci KD, ale na rozdíl od ní je vylepšená v tom, že se provádí odběr nejen tekutiny tedy kostní dřeně, ale zároveň se odebírá i malá část myeloidní tkáně. Histologická laboratoř poté zkoumá strukturu kosterní tkáně a hledá vzájemný vztah s buňkami kostní dřeně. Výkon je u dospělého člověka prováděn s lokální anestezií, u dětí je odebírána v anestezii celkové. Místem odběru je zadní strana kosti kyčelní. Odebraná dřeň ve válečku s Löwyho roztoku je odesílána na histologické vyšetření. Vzorek se zpracovává v několika možnými barvicími technikami, jako je barvení hematoxylinem a eozinem nebo Maye–Grünwald a Giemsa. Zároveň se často provádí i „otiskový“ preparát, kdy se udělá otisk válečku na sklíčko pro cytologické pozorování pod mikroskopem v panoptickém barvení (Souček, 2011).

### **1.8.3 Genetické vyšetření**

#### **Polymerázová řetězová reakce**

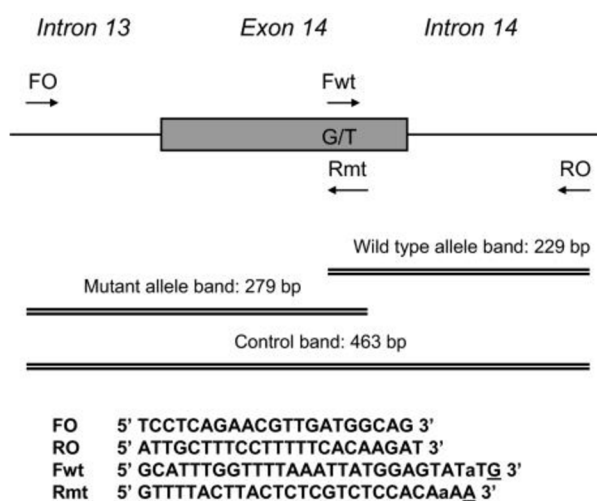
Dr. Kary Mullis byl americký biochemik, byl objevitelem této techniky nazývaní se zkráceně PCR podle anglického názvu „polymerase chain reaction“. Jedná se o jednoduchý a elegantní, enzymatický test, který umožňuje amplifikaci konkrétního fragmentu z komplexního souboru DNA. PCR může být prováděna za použití zdrojové (templátové) DNA z různých tkání a organismů, včetně periferní krve, kůže, vlasů a slin. K provedení testu je potřeba zmiňovaná templátová DNA, primery, nukleotidy a DNA polymerázy. DNA polymeráza je klíčovým enzymem, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku našeho kóženého PCR produktu. Nukleotidové báze – adenin, thymin, cytosin a guanin (A, T, C, G) – které se nacházejí v DNA, působí jako stavební kameny, které používá DNA polymeráza k vytvoření výsledného produktu PCR. Primery jsou krátké fragmenty DNA s definovanou sekvencí komplementární k cílové DNA, která má být detekována a amplifikována. Slouží jako prodloužení pro navázání DNA polymerázy. Vzniklou reakční směs ve zkumavce nebo v jamkové destičce umístíme do stroje, konkrétně do tepelného bloku. Ten umožňuje diskrétně a opakovaně zvyšovat a snižovat teplotu ve třech základních cyklech. Přístroj pracuje na principu již před programovaných kroků. Reakční roztok se nejprve zahřeje nad teplotu tání, čímž dojde k denaturaci DNA. Je to reverzibilní děj, kdy vlákna k sobě komplementární se rozpojí a vzniknou dva samostatné řetězce. Teplota se sníží a v tu chvíli dojde k navázání specifických primerů na cílové segmenty DNA, což je proces známý jako hybridizace nebo nasedání. K žihání mezi primery a cílovou DNA dochází pouze, pokud jsou komplementární v sekvenci (např. vazba A na G). Teplota se opět zvýší, když je DNA

polymeráza schopna prodloužit primery přidáním nukleotidů do vyvíjejícího se řetězce DNA. S každým opakováním těchto tří kroků se počet všech molekul DNA zdvojnásobí (Garibyan et al., 2014).

Po skončení PCR cyklů následuje vizualizační zpracování produktu. Existují dva hlavní způsoby. Za prvé barvení DNA chemickým barvivem jako je ethidiumbromid, nebo značení PCR primerů nebo nukleotidů fluorescencí barviva (fluorofory) před PCR amplifikací. Druhou nejpoužívanější a nejjednodušší metodou vizualizace je elektroforéza na agarózovém gelu, která odděluje produkty DNA na základě velikosti a náboje. Do gelu se zároveň nanáší kontrola, kterou je předem určený produkt DNA o známé velikosti. Napomáhají nám určit velikost produktu. Po elektroforetickém dělení DNA přidáme roztok ethidium bromidu, kterým zviditelníme proužky pod UV světlem. Metoda je ve všech ohledech skvělá, ale má také své nedostatky, například DNA polymeráza použitá při PCR reakci je náchylná k chybám a může vést k mutacím v generovaném fragmentu. Dále specifická generovaného produktu PCR může být změněna nespecifickou vazbou primerů na jiné podobné sekvence na templátové DNA. Aby bylo možné navrhnout primery pro generování produktu PCR, jsou obvykle nutné předchozí informace o sekvenci (Garibyan et al., 2014).

### Amplifikační refrakterní mutační systém – PCR

Z prvotní obyčejné PCR byly postupem času odvozeny různé modifikace, které diagnostiku posunuly na vyšší úroveň. Na obrázku 3 můžete vidět schéma techniky ARMS–PCR. Právě tuto analýzy budu používat ve své praktické části, kde je i blíže popsán její princip.



Obrázek 3: Schéma testu ARMS–PCR.

Zdroj: Chan et al., 2007

## **2. Cíle práce a hypotéza**

### **2.1 Cíl práce**

1. Popis myeloproliferativních onemocnění obecně i jednotlivých typů
2. Uvedení kritérií pro určení diagnózy
3. Popis používaných laboratorních metod při diagnostice
4. Zpracování dat statisticky
5. Vyhodnocení získaných dat
6. Zmapování výsledků chromozomálních aberací myeloproliferativních syndromů

### **2.2 Výzkumné otázky**

- Jaká je distribuce jednotlivých typů MPS u pacientů?

### 3. Metodika

Když dorazí vzorek pacienta do nemocnice na příjem centrální laboratoře je řádně zkontrolován a přeposlán na příslušné oddělení. V našem případě do laboratoře molekulární biologie a genetiky. Následuje příjem materiálu a jeho zpracování. Každý biologický materiál se bere jako potenciálně infekční, tudíž jsou pracovníci povinni použít ochranné pomůcky, jako jsou jednorázové rukavice, ochranný oděv, roušku, případně další pomůcky. V empirickém výzkumu jsem použila vyšetřovací metody ARMS-PCR, fragmentační analýzu, elektroforézu a Real-Time PCR. K následujícímu vyšetření běžně stačí nesrážlivá žilní krev o objemu 3–5ml ve zkumavce s antikoagulačním činidlem (K3EDTA). Většinu analýz je možné provést i z minimálního množství vzorku.

#### 3.1 Izolace DNA fenol–chloroformem a purifikace

Izolace či extrakce DNA z buněčného jádra je prvním krokem při laboratorním zpracování vzorků nejen v mé praktické části, ale je základem valné většiny genetických metod.

##### **Použité reagensie:**

Uvedené množství je pouze pro jeden vzorek a odvíjí se od množství zpracovávané krve.

- Vzorek nesrážlivé krve = 3ml
- Red Blood Cell Lysis Buffer = 16ml
- White Blood Cell Lysis Buffer = 1,5ml
- Protein Precipitation Solution = 0,780ml
- Vymražený 96% ethanol = 1ml
- 96% ethanol = 6ml
- Eluční pufr = 200-400  $\mu$ l (podle odhadované koncentrace DNA)

##### **Provedení:**

Do označené 50 ml zkumavek jsem Pasterovo pipetou přenesla lyzační roztok Red Blood Cell Lysis Buffer (RBCL) v poměru 9ml pufru ke 3ml krve. Zbylá nezpracovaná krev se uchovává pro případná další vyšetření. Zkumavku jsem dala na 15-30 minut třepat na vertikální třepačku při 150 rpm, (v případě nedostatečné lýzi buněk lze dobu prodloužit). Následně byl vzorek zcentrifugován: 10 min při 900 ot.. Poté jsem slila supernatant a krátce ji zvortexovala. Do zkumavky jsem dala druhou dávku lyzačního

roztoku pro erytrocyty cca 7ml. Zopakovala jsem inkubaci, centrifugaci a odlití supernatantu. Zbylí sediment jsem roztřepala pomocí vortexu. Poté jsem napipetovala 1,5ml White Blood Cell Lysis Buffer, zkumavku jsem musela promíchat pouze opakovaným převrácením. Musí se ohlídat, zda vzorek obsahoval heparin. Pokud ano, následovala by inkubace při 65 °C / 10 min. Následně jsem přidala Protein Precipitation Solution, na 3ml krve se přidává 0,780ml proteinu. Vzorek jsem zortexovala asi 1,5 min a následně dala zcentrifugovat na 10 min při 1200 ot.. Z centrifugované zkumavky jsem slila supernatant do čisté označené 50 ml zkumavky. Přidala jsem cca 2 díly, tedy přibližně 6ml 96% ethanolu vytemperovaného na pokojovou teplotu. Poté jsem krouživým pohybem zkumavky vysrážela DNA. Sraženou DNA jsem pak nasála špičkou a přenesla do popsané 1,5 ml mikrozkušavky s přidáním cca 1ml vymraženého ethanolu. Krátce ji nechala stočit, aby DNA klesla ke dnu a ethanol opatrně Pasteurovou pipetou odsála. Následovalo sušení vzorku: otevřenou mikrozkušavku zakrytou skleněným trychtýřem jsem nechala sušit v boxu do úplného vyschnutí.

Poté jsem produkt rozpustila ve 200 µl AE pufru a dala ho do inkubátoru na 30–45 minut při 65°C. Závěrem bylo provedeno měření koncentrace DNA pomocí přístroje PicoDrop. Koncentrace DNA mi vyšla v požadovaném rozmezí 5–100 ng/µl. Ze zkumavky jsem odebrala 100 µl a převedla je do nové popsané sterilní mikrozkušavky. Takovýto vzorek je připraven k dalšímu zpracování (Scheinost, © 2012).

### **3.2 Stanovení mutace v genu JAK2**

Účelem vyšetření je detekce bodové mutace v genu pro Janusovu kinázu 2. K detekci mutace používají v laboratoři, kde jsem prováděla svou praktickou část, metodu ARMS–PCR. Což je PCR se dvěma páry primerů a dochází zde k namnožení specifického úseku mutované i nemutované alely genu. Podle toho, zda se zde nachází či nikoliv. Pro vyšetření je vyžadován vzorek periferní krve ve sterilní zkumavce s přísadkem EDTA.

#### **3.2.1 ARMS–PCR**

##### **Princip metody:**

PCR se provádí v přístroji zvaném termocycler. Je zkonstruován, tak aby dokázal během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia. Ohřívá a chladí vzorky v opakujících se cyklech, aby usnadnil amplifikaci DNA, popřípadě RNA

prostřednictvím polymerázové řetězové reakce. PCR typicky vyžaduje 20 až 35 cyklů zahrnujících dva až tři teplotní kroky (denaturace, žíhání a extenze).

Jedna z modifikací obyčejné PCR je ARMS-PCR plným názvem amplifikační refrakterní mutační systém. Jedná se jednoduchou metodu pro detekci jakékoli mutace zahrnující změny jedné báze nebo malé delece. Je založena na použití sekvenčně specifického reverzního primeru a dvojici forward primerů, jeden specifický pro mutantní alelu a druhý pro normální alelu. Dva počáteční a dva reverzní primery se používají různých kombinacích k vytvoření tří potenciálních produktů PCR. V našem případě primery FO a RO lemují exon 14 genu JAK2, což vede k pruhu 463 bp (pro kontrolu kvality). Primery Fwt a RO amplifikují nemutovanou alelu (WT) vytvářející pás 229 bp. Primery FO a Rmt generují pruh 279 bp z mutantní alely.

Touto metodou je umožněna detekce cílové alely, pokud je ve vzorku obsažena. Výborně se hodí právě pro genotypovou analýzu JAK2 V617F, protože V617F je získaná mutace, která může být v některých případech přítomna pouze v malém podílu granulocytární populace. Zejména u ET je nezbytná vysoce citlivá detekční metoda (Chan., et al., 2007; Křístková et al., 2009).

#### **Použité reagensie:**

Uvedené množství je pouze pro jeden vzorek.

##### MASTER MIX 1.

- PCR H<sub>2</sub>O = 5,0 µl
- Combi PPP MM = 12,5 µl
- Primer JAK – FO (10 uM) = 1,0 µl
- Primer JAK – RO (10 uM) = 0,75 µl
- Primer JAK – Fwt (10 uM) = 1,25 µl
- Primer JAK – Rmt (10 uM) = 2,5 µl

##### MASTER MIX 2.

- PCR H<sub>2</sub>O = 5,0 µl
- Combi PPP MM = 12,5 µl
- Primer JAK – FO (10 uM) = 2 µl
- Primer JAK – Rmt (10 uM) = 2 µl

#### **Provedení:**

Nejprve jsem si připravila dva master mixy, což je směs, kde jsem smíchala reagensie v určitém poměru na počet momentálně testovaných vzorků. V této metodě se dělají dvě řady, každá s jinými primery pro jedny vzorky.

Já jsem ke stanovení měla 11 patientských vzorků plus se přidává pozitivní a negativní kontrola. Tudiž jsem měla 13 zkumavek. Do 1. master mixu jsem dala H<sub>2</sub>O 65 µl, Combi PPP MM 162,5 µl, Primer FO (10 uM) 13 µl, Primer RO (10 uM) 9,75 µl, Primer Fwt (10 uM) 16,25 µl, Primer Rmt (10 uM) 32,5 µl. Mix číslo 2. obsahoval H<sub>2</sub>O 65 00, Combi PPP MM 162,5 µl, Primer FO (10 uM) 26 µl, Primer Rmt (10 uM) 26 µl. První mixem se prokazuje jak mutovaná, tak nemutovaná alela, kdežto druhý mix je pouze na průkaz mutované alely. Tím lze získat velmi přesný výsledek (Scheinost, © 2016).

Připravenou směs mixu 1 jsem si rozplnila po 23 µl do připravených mikrozkušavek, které jsem označila čísly 1–13 a červenou tečkou, abych odlišila řadu jedna a řadu dvě. Směs mixu 2 jsem stejným způsobem rozpipetovala, avšak po 21,5 µl. Poté jsem v izolačním boxu přidala do každé zkumavky v obou řadách 2µl izolované DNA, krom 11. pozice pro negativní kontrolu se nedává nic.

Vlastní amplifikace probíhá v termocycleru cca 2 hodiny podle následujícího teplotního programu: první cyklus denaturace probíhá 3 minuty při 94°C. Dále následuje 35 cyklů. Každý z nich má 3 kroky. Denaturace 30s na 94°C, 30s annealing při 60°C a elongace 72°C na 60s. Po těchto 35 cyklech následuje 1x extenze na 5 min při 72°C a poté ochlazení vzorků na 10°C (Scheinost, © 2013).

### **3.2.2 Detekce PCR produktů pomocí ELFO**

#### **Výroba agaóзовého gelu:**

Smíchala jsem 2 g agarózy a 100 ml 0,5×TBE pufru. Směs jsem vložila do mikrovlnné trouby a nechala důkladně provařit. Následně jsem směs nechala zchladnout asi na teplotu 60 °C a poté jsem přidala 5 µl barviva ethidiumbromid pro závěrečnou vizualizaci produktů. Pečlivě jsem vše promíchala a nalila směs do elektroforetické vaničky s hřebínkem, pomocí něhož mi následně vznikly potřebné jamky. Gel tuhnul 1 hodinu (Scheinost, © 2013)

#### **Princip gelové elektroforézy:**

Základní princip metody je pohyb záporně nabitých částic, v našem případě DNA a její fosfátové skupiny, v elektrickém poli směrem ke kladné elektrodě. Díky tomu, a také díky rozdílné velikosti molekul DNA, které putují gelem různou rychlostí. Rychlost separace je nepřímo úměrná k velikosti částic. Agarózový gel vytváří složitou síť z polymerních molekul a pórů. Lze vytvořit různá hustota gelu závislé na množství agarózy. Ta se rozpouští v TBS pufru (tvořen Tris. kyselinou boritou a EDTA), který se



také používá jako elektrolyt, do něhož se gel vkládá. Vzorky se nanáší do jamek a klesají na dno, což je zajištěno zatěžkávacím vkládacím pufrem. Pro odhad velikosti fragmentů se do krajní jamky dává velikostní marker, který vytvoří žebřík proužků od 1000bp po 100bp. Do gelu se také přidává barvivo ethidiumbromid nebo SYBR Green, díky kterému se pod UV světlem zviditelní fragmenty DNA (Biopedia © 2020).

### **Provedení:**

Nejprve jsem připravila směsi PCR produktů a nanášecího roztoku, které se poté nanášejí na gel. V prvním kroku jsem vzala všech 13 PCR produktů s master mixem 1. Označila jsem si 13 nových mikrozkušavek čísly 1–13 a červenou tečkou. Z každého PCR produktu jsem si odpipetovala 4 $\mu$ l do nových označených zkumavek a přidala cca 7  $\mu$ l nanášecího roztoku. S dalšími 13ti PCR produkty s master mixem 2 jsem udělala to samé, ale zkumavky jsem označila číslicemi a zelenou tečkou, aby byl poznat rozdíl ve složení.

Nyní sem mohla přejít k samotnému nanášení směsi do gelu, který jsem již vložila do elektroforetické vany s elektrolytem. Gel by měl být zcela ponořený. Do prvního řádku jamek jsem pipetovala celý objem směsi z červeně značených zkumavek a ve správném pořadí od 1 do 13. Do druhého řádku jsem pipetovala tentokrát směsi ze zkumavek zeleně značených. Důležité je říct, že na začátku každého startu tedy v první jamce je nanesen DNA ladder jako hmotnostní standard, od kterého odečítáme výsledek. Dále na dvou posledních pozicích je vždy umístěna negativní a pozitivní kontrola. V mém případě se na 12. pozici nachází negativní kontrola. V tomto vzorku není žádná DNA tudíž by pozice měla být bez jakéhokoli signálu. Na 13. pozici je kontrola pozitivní, kde se musí objevit pruh odpovídající mutované alele o 279bp. Po nanesení jsem přístroj zapnula a spustila tak separaci pod napětím cca 120 V. Po uplynutí asi 1 hodiny byli produkty dostatečně rozděleny. Zastavila jsem přívod proudu, vyjmula gel a dala ho pod zobrazovací přístroj s UV světlem. Pořídila snímek, který se vyhodnotí a uloží (Scheinost, © 2013).

### **3.2.3 Výsledky**

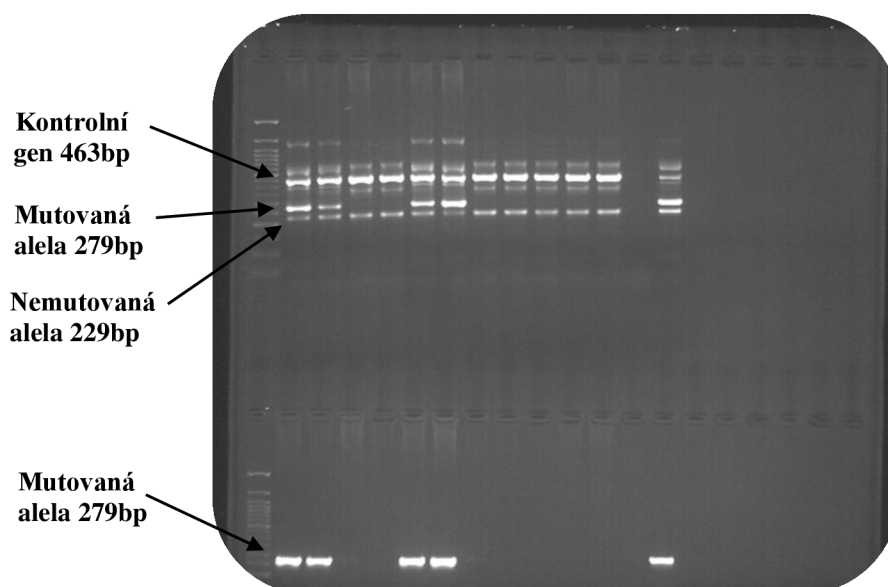
V gelu (viz. Obrázek 4) došlo k separaci PCR produktů podle velikosti fragmentů. Díky velikostnímu markeru a znalosti toho, jaké fragmenty jsou u mutované a nemutované alely jsem mohla odečíst výsledky. Do horní části gelu jsem nanášela vzorky s master mixem 1 se dvěma páry primerů. Pacienti 3,4,7,8,9,10 a 11 s fragmenty o velikosti 463 bp (kontrolní gen) a 229bp (nemutovaná alela) jsou negativní. Ale pacienti 1,2,5 a 6, kteří mají pruh 279 bp navíc jsou jasně pozitivní na mutaci v genu JAK2. Ve

spodní lajně je vidět proužek pouze u toho, kdo vyšel pozitivně i v prvním řádku. To proto, že do spodního řádku jsem nanášela vzorky s master mixem 2, který obsahoval primery kompatibilní k fragmentu značící mutaci. Takto dvojitě se metoda provádí z důvodu dokonalé kontroly výsledků. Mé vyhodnocení je zaznamenáno v Tabulce 1. Celkem tedy vyšly 4 osoby pozitivně a dalších 7 bylo negativních.

*Tabulka 1: Výsledky vyšetření JAK2 mutace.*

Číslo vzorku	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Výsledek	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.
Číslo vzorku	8.	9.	10.	11.	12.	13.	
Výsledek	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg. C	Poz. C	

*Zdroj: genetická laboratoř*



*Obrázek 4: Výsledek separace vzorků v agarózovém gelu.*

*Zdroj: genetická laboratoř*

### 3.3 Stanovení mutace v genu CALR

Při stanovování této mutace se nejprve provede extrakce DNA. Dalším krokem po izolaci je amplifikace stanovovaného úseku opět metodou PCR, po které následuje fragmentační analýza, která slouží k detekci případných genetických změn.

#### 3.3.1 Fluorescenční PCR

##### **Použité reagensie:**

Uvedené množství je pouze pro jeden vzorek

- H<sub>2</sub>O pro PCR = 8 µl

- Combi PPP Master Mix = 12,5  $\mu$ l
- Primery F a R (forward a reverse) – Lyofilizované primery se rozpouštějí podle doporučení výrobce na zásobní koncentraci 100  $\mu$ M a poté jsou ředěny na pracovní koncentraci 10  $\mu$ M (5  $\mu$ l primeru + 45  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) = 1  $\mu$ l F a R primeru
- Izolovaná DNA = 2,5  $\mu$ l

#### **Provedení:**

Nejprve jsem připravila určité množství master mixu na počet vyšetřovaných vzorků a kontrol. Bylo mi poskytnuto 6 vzorků od pacientů. Dále se dává zkumavka s negativní kontrolou a 2 zkumavky s nejčastějšími genetickými změnami, což je 1 kontrolní inserce 5pb a 1 kontrolní delece 50pb. Tudíž jsem pro vytvoření primární reakční směsi na 9 vzorků smíchala 112,5  $\mu$ l Combi PPP Master Mix, Primer F 9  $\mu$ l, Primer R 9  $\mu$ l a H<sub>2</sub>O pro PCR 72  $\mu$ l.

Hotový master mix jsem rozpipetovala po 22,5  $\mu$ l do 9 popsanych mikrozkuavek o objemu 0,2ml. Následně jsem přidala 2,5  $\mu$ l vyizolované DNA (v koncentračním rozmezí 20–100  $\mu$ g/ml). Takto připravenou směs jsem vložila do thermocycleru, kde proběhla amplifikace úseku DNA v teplotních cyklech, první cyklus je denaturace a probíhá 3 minuty při 94°C. Dále následuje 35 cyklů, každý z nich má 3 kroky. Denaturace 30s na 94°C, 30s annealing při 61°C a elongace 72°C na 60s. Po těchto 35 cyklech následuje 1x extenze na 5 min při 72°C. Metoda končí ochlazením vzorků na 10°C (Scheinost, © 2013).

### **3.3.2 Fragmentační analýza**

#### **Princip metody:**

Přístroj funguje na principu kapilární elektroforézy. Cílem této metody je zjistit délku fragmentu DNA. Do analyzátoru se vkládá destička se stripy, z nichž si pipeta nasává vzorek. Nejprve dochází k dělení fragmentů DNA na základě jejich velikosti a náboje. Fragmenty jsou z obou stran označeny primerem, jeden s fluorochemem a druhý bez. Ke každému vzorku se také přidává velikostní standard. Následně při průchodu kapilárou a po ozáření laserem barevně značené úseky emitují světlo o různé intenzitě. Analyzátor detekuje signály a ty se zaznamenají jako píky. Zajímá nás velikost daného fragmentu a jeho kvantita, která je však relativní. Velikost zjistíme porovnáním každého píku vůči známému standardu pro testovaný gen. Analyzátor zvládne stanovit více fragmentů na jednu označeny různými barvami (Štouračová, 2009).

**Použité reagensie:**

- PCR produkt = 1  $\mu$ l
- dH<sub>2</sub>O = 199  $\mu$ l
- Hi-Di-Formamid = 20  $\mu$ l
- GeneScan™ 500 LIZ™ (velikostní standard) = 0,1  $\mu$ l

**Provedení:**

Vzniklé PCR produkty jsem 200x ředila (199  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O + 1  $\mu$ l PCR produktu). Pokračovala jsem vytvořením reakční směsi. Do každé mikrozkušavky jsem napipetovala 20  $\mu$ l formamidu k němu jsem opět do každé zkumavky přidala 0,1  $\mu$ l Marker LIZu což je velikostní standard. Následně jsem si stojánek přenesla do PCR boxu. Zde jsem podle pipetovacího protokolu (viz. Obrázek 6) přidávala 1  $\mu$ l 200x zředěného PCR produkt. Pipetou jsem vše pečlivě promíchala. Na každou zkumavku jsem nasadila septum a následně je zvortexovala. Poté jsem zkumavky umístila do termocycleru na 3 minuty při teplotě 94°C, kde došlo k denuraci. Takto připravené vzorky jsem vložila do destičky, kterou jsem umístila do přístroje pro fragmentační analýzu (ABI Prism 310 Genetic Analyser). Před spuštěním se zapsaly polohy vzorků v destičce do listu. Následně jsme s kompetentním laborantem analyzátor spustili. Každý vzorek byl měřen 28 min. Po ukončení běhu se naměřené výsledky vždy samy otevrou v programu GeneScan, kde se vizualizují ve formě píků na ose x a y. Na ose y jsou vzorky zobrazovány jeden po druhém a na ose x je ukázáno počet bazí. Výsledky se porovnávají s referenční hodnotou a se dvěma markery, jednou inzercí a jednou delecí v genu kódující CALR (Scheinost, © 2012; Scheinost, © 2016).



Obrázek 5: Genetický analyzátor ABI310 pro fragmentační analýzu.

Zdroj: vlastní

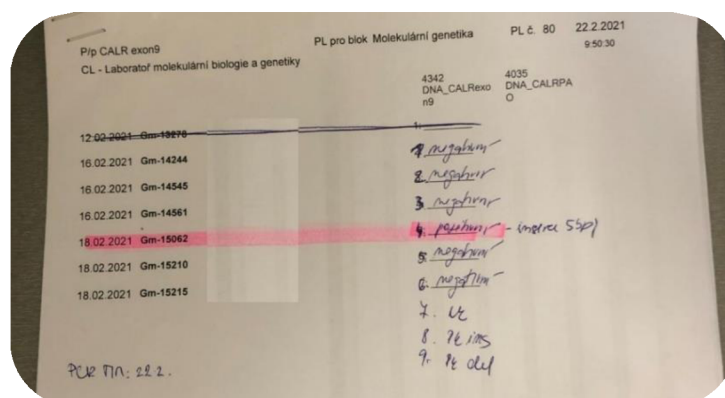
### 3.3.3 Výsledky

Z výsledků v Tabulce 2 je patrné, že pouze pacient číslo 4. je pozitivní na inzerci v genu pro CALR. Na Obrázku 7 vidíte výsledky záznamy ve formě píků z fragmentační analýze. V řádcích 1–5 jsou vybrané výsledky pacientů z našeho stanovení. V šestém řádku je pozitivní kontrolní marker pro inzerci tohoto genu a v sedmém je druhý stanovovaný marker delece. Jak můžete vidět 2 a 6 řádek se vizuálně podobá. Tudíž můžeme s jistotou vyhodnotit, že pacient má inzerci v prokazovaném genu. U ostatních pacientů aberace nebyla prokázána.

Tabulka 2: Výsledky vyšetření mutace v genu CALR.

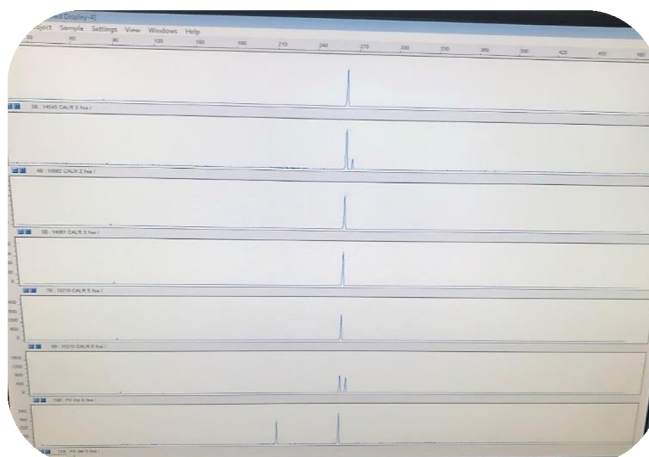
Číslo vzorku	1.	2.	3.	4.	5.
Výsledek	Neg.	Neg.	Neg.	Poz. Inzerce	Neg.
Číslo vzorku	6.	7.	8.	9.	
Výsledek	Neg.	Neg. C.	PK inzerce	PK delece	

Zdroj: genetická laboratoř



Obrázek 6: Pipetovací protokol se zápisem výsledků.

Zdroj: vlastní



Obrázek 7: Počítačem zaznamenané výsledky pouze vybraných pacientů.

Zdroj: genetická laboratoř

### 3.4 Stanovení mutace MPL W515K, L

#### 3.4.1 Real-Time PCR

##### **Princip metody:**

Základní termocycler byl inovován, aby dokázal kvantitativně stanovit množství vzorku v reálném čase. Tato metoda se nazývá Real-Time PCR. Došlo tak ke zjednodušení průběhu reakce, kdy je měření průběžně zaznamenáváno, což eliminuje následnou potřebu detekce DNA v gelové elektroforéze (Biopedia © 2020).

##### **Použité reagensie:**

Uvedené množství je pouze pro jeden vzorek

- H<sub>2</sub>O pro PCR = 2,5 µl
- TaqMan Universal PCR Master Mix = 6,25 µl
- Primers and Probe Mix PPM-MPL (jeden pro mutaci W515K, a druhý pro W515L) = 1,25 µl
- Izolovaná DNA = 2,5 µl

##### **Provedení:**

Nejprve jsem si připravila master mix. Měla jsem 8 vzorků od pacientů, potom na 9. pozici byla negativní kontrola na 10. kontrola COS a 11. byla pozitivní kontrola. Vždy se dělá master mix na počet vzorků a kontrol plus o jednu navíc kdyby se něco pokazilo. Pro každý vzorek jsem připravila dvě reakční směsi. Jako první jsem si smíchala 27,5 µl H<sub>2</sub>O pro PCR se 68,75 µl TaqMan master mix a primers a probe mix pro změnu W515K. Ve druhé reakční směsi bylo 27,5 µl H<sub>2</sub>O pro PCR se 68,75 µl TaqMan master mix a primers a probe mix pro změnu W515L. Oba master mixy jsem měla v zásobních zkumavkách, ze kterých jsem si pipetou přenášela 10 µl do sterilních PCR stripů, které jsem měla v chlazeném stojánku. Vzala jsem si dva stripy, první jsem označila zeleně a do něho napipetovala po 10 µl ze zásobní zkumavky s master mixem číslo 1 (neboli s primerem pro změnu W515K). Druhý strip jsem označila červeně a opět napipetovala 10 µl ze zásobní zkumavky tentokrát s master mixem číslo 2 (s primerem pro W515L).

Stojánek se stripy jsem si přenesla do izolačního PCR boxu, kde jsem přidala do obou stripů na pozici 1–7 2,5 µl vyizolované DNA a naředěnou vodou (koncentrace 5 µg/ml). Postupovala jsem dle pipetovacího protokolu. Na pozici 9, kde je negativní kontrola, jsem nepřidala nic. Do 10. pozice jsem dala kontrolu COS a do 11. pozitivní kontrolu buď pro W515K nebo pro W515L.

Stripy jsem uzavřela a dala stočit na stolní centrifuze přímo pro stripy a poté jsem je vložila do termocycleru (Light Cycler 480). V master mixech jsou hydrolyzační sondy, které mají na 5' konci reportérový fluorochrom a na 3' straně je tzv. zhášeč. Funguje to tak, že pokud se tyto sondy nenaváží, zhášeč blokuje barevný reportér. Pokud sonda najde komplementární sekvenci, na kterou se naváže zhášeč, nemůže blokovat fluorochrom, který při detekci emituje energii a my vidíme barevný signál.

V přístroji je reakce zahájena 1 cyklem denaturace při 50°C po dobu 2 min. Následuje druhý cyklus aktivace taq. polymerázou, což je termostabilní DNA polymeráza. Probíhá při 95°C po dobu 10 min. Následuje 50 cyklů, kdy se kvantifikuje DNA. Střídají se zde 2 teploty. 92°C na 15s a 60°C na 60s. Poté ještě běží 1 cyklus extenze za teploty 60°C na 1 min. a posledním cyklus je ochlazování 60°C, 30s. Přístroj sám rovnou detekuje fluorescenci v kanálech VIC a FAM a zaznamenává výsledky (Scheinost, © 2017).

### 3.4.2 Výsledky

Naměřená data jsou analyzována systémem end point genotypizace, ze získaných absolutních hodnot fluorescence pro kanály FAM a VIC je vypočítán jejich rozdíl podle vzorečku:

$$x = \frac{\text{fluorescence v kanálu FAM}}{\text{fluorescence v kanálu VIC}}$$

Hodnota  $X$  je vypočítána také pro kontrolní vzorky COS ( $X_{\text{cos}}$ ), jejichž hodnota slouží pro nastavení detekčního limitu. V kontrole COS je mutantní alela zastoupena přesně v 1%.

<b>negativní</b>	$X < X_{\text{cos}}$
<b>nehodnotitelné</b>	$X = X_{\text{cos}}$
<b>pozitivní</b>	$X > X_{\text{cos}}$

Nic se nemusí počítat, jelikož počítačový program zaznamená hodnoty do tabulky a automaticky z nich vypočítá výslednou hodnotu neboli score. My pouze porovnáme, zda je score nižší nebo vyšší než  $X_{\text{cos}}$  a podle toho víme, jestli pacient má aberaci či nikoli.

Dle výsledků na obrázcích 10 a 11 jsem vyhodnotila výsledek u každého pacienta a zapsala je do tabulky 3. Nikdo z pacientů nebyl pozitivní jak na mutaci MPL W515K ani na mutaci W515L.

Tabulka 3: Výsledky vyšetření na mutaci v genu MPL.

<b>Číslo vzorku</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>3.</b>	<b>4.</b>	<b>5.</b>	<b>6.</b>
<b>Výsledek</b>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
<b>Číslo vzorku</b>	<b>7.</b>	<b>8.</b>	<b>9.</b>	<b>10.</b>	<b>11.</b>	
<b>Výsledek</b>	Neg.	Neg.	Neg. C	COS C	Poz. C	

Zdroj: genetická laboratoř

Endpoint Genotyping for MPL W515K (Endpoint Genotyping)

Results

Inc	Pos.	Sample Name	Endpoint Fluorescence		Call	Score	Status
			Allele X	Allele Y			
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	5959	0,42	19,48	Allele Y	0,61	
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	7932	0,36	17,72	Allele Y	0,61	
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	8246	0,46	20,31	Allele Y	0,61	
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	8247	0,59	25,15	Allele Y	0,61	
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	8260	0,54	22,85	Allele Y	0,61	
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	8271	0,46	22,66	Allele Y	0,61	
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	8274	0,46	22,27	Allele Y	0,61	
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	8974	0,35	19,81	Allele Y	0,60	
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	NK	0,01	0,28	Negative		
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	PK cos	3,72	18,28	Both Alleles	0,78	*
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	PK mut	24,89	0,92	Allele X	0,60	

\* - Manually edited

Obrázek 8: Výsledky měření pro mutaci MPL W515K.

Zdroj: genetická laboratoř

Results

Inc	Pos.	Sample Name	Endpoint Fluorescence		Call	Score	Status
			Allele X	Allele Y			
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	5959	1,67	26,36	Allele Y	0,86	
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	7932	1,56	23,52	Allele Y	0,87	
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	8246	1,72	25,33	Allele Y	0,87	
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	8247	1,91	28,51	Allele Y	0,87	
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	8260	1,60	25,55	Allele Y	0,86	
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	8271	1,80	27,24	Allele Y	0,87	
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	8274	1,59	24,66	Allele Y	0,86	
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	8974	1,43	22,29	Allele Y	0,86	
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	NK	0,00	0,22	Negative		
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	PK cos	7,77	28,21	Both Alleles	0,91	*
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	PK mut	37,19	5,69	Allele X	0,90	

\* - Manually edited

Obrázek 9: Výsledky měření pro mutaci MPL W515L.

Zdroj: genetická laboratoř



## 4. Výsledky

### 4.1 Charakteristika výzkumného souboru

Z dat poskytnutých od Nemocnice České Budějovice a.s. jsem vyfiltrovala pacienty, kteří měli zaznamenaný výsledek vyšetření. V tabulkách jsou seřazeni posloupně a očíslováni. Laboratorní vyšetření byla prováděna především z periferní krve, což je v tabulkách zaznamenáno pod názvem materiál (viz. Tabulky 11–13 v příloze). Vytvořila jsem tedy 3 souhrnné tabulky z každého období, jimiž jsou roky 2017, 2018 a 2019. Vzorky mnou zpracované jsem dala do poslední tabulky a zahrнула jsem je do statistických výpočtů. Z těchto tabulek jsem provedla sumarizaci a procentuální vyhodnocení podle výsledků vyšetření k jednotlivým typům aberací způsobující MPS. Hovořím o bodové mutaci genu Janusovi kinasy 2, MPL a genové mutaci pro kalretikulín. Fúzní onkogen BCR–ABL způsobuje chronickou myeloidní leukémii, která je klasifikována jako Ph1 pozitivní myelprolyferativní onemocnění. V práci se však zaměřuji na Ph1 negativní MPS. Do celého výzkumu jsem tuto aberaci začlenila záměrně, protože při jejím potvrzení se pacient automaticky zařadí do Ph1 pozitivní kategorie a jsou vyloučeni z dalšího testování.

Pro přesné znázornění jsem tyto data vynesla do koláčových grafů. Následně jsem provedla kompletaci výsledků ze všech tří období sloučením sumarizačních tabulek a opětovným vynesem dat, tentokrát do sloupcového grafu. V závěru jsem provedla porovnání hodnot výskytu mutací s hodnotami odborné studie.

## 4.2 Statistické zpracování výsledků

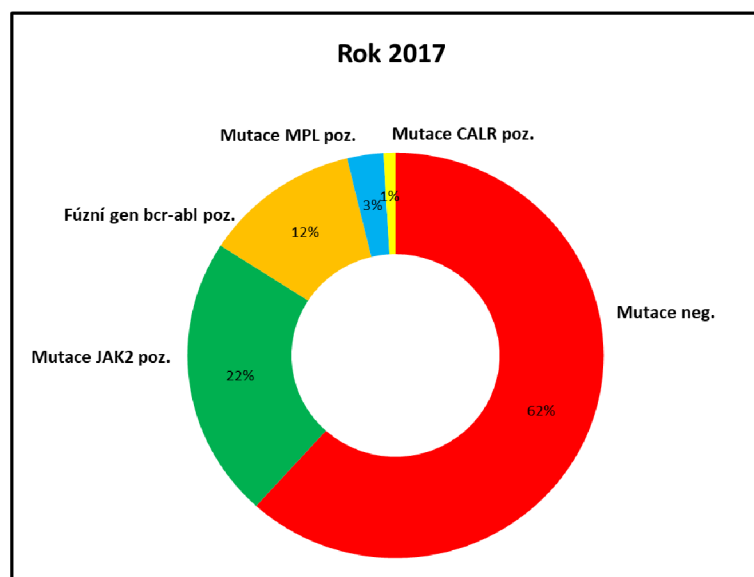
### 4.2.1 Data – rok 2017

Za rok 2017 přišlo do laboratoře 107 patientských vzorků podezřelých na MPS. Podle výsledků uvedených v Tabulce 4 jsem zjistila, že z celkového počtu pacientů bylo 66 negativních případů (odpovídá 61,68%). Mutace fúzního onkogenu BCR–ABL byla prokázána u 13 osob (12,15%), jejím potvrzením se mi tyto lidé automaticky vyřadili z diagnostiky Ph–negativních myeloproliferativních onemocnění. Pozitivita mutace JAK2 se prokázala u 24 pacientů (22,43%). Ve třech případech (2,80%) se objevila aberace v MPL genu a pouze u jedné osoby (0,93%) se potvrdil pozitivní nález mutace CALR. Všechny údaje jsou přehledně zobrazeny v koláčovém grafu na Obrázku 10.

Tabulka 4: Celkový počet pacientů s danou mutací, procentuální zastoupení.

Rok 2017		
Mutace	Počet	Procenta
Mutace neg.	66	61,68%
JAK2 poz.	24	22,43%
BCR-ABL poz.	13	12,15%
MPL gen poz.	3	2,80%
CALR poz.	1	0,93%
celkem	107	100%

Zdroj: vlastní



Obrázek 10: Koláčový graf v procentech za rok 2017.

Zdroj: vlastní

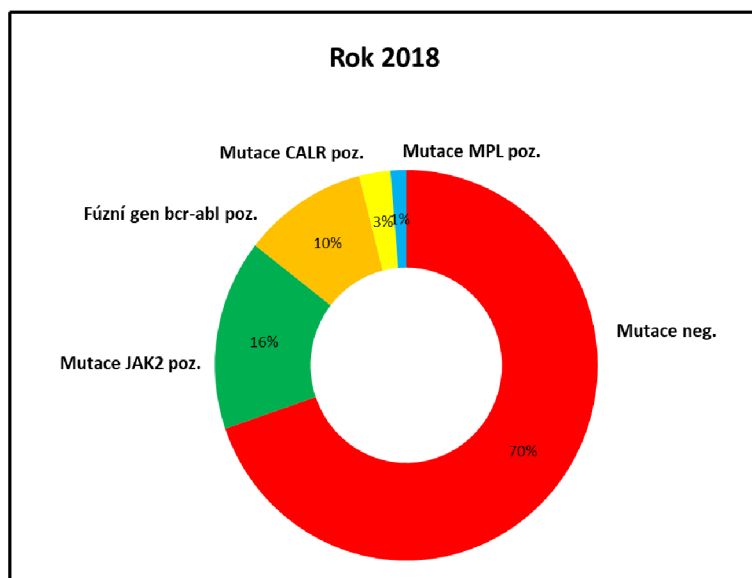
#### 4.2.2 Data – rok 2018

Dle nashromážděných dat za rok 2018 víme, že bylo provedeno vyšetření u 77 pacientů s podezřením na MPS. Rozsah pacientů, u kterých se vyšetření provádělo je o poznání nižší než v předešlém roce, a to i v roce následujícím. V koláčovém grafu na Obrázku 11 je červenou barvou vyznačen úsek o 53 pacientech (68,83%), kteří byli vyhodnoceni jako negativní k jakékoli z našich aberací. U 8 lidí (10,39%) se prokázala mutace BCR–ABL, řadí se tudíž do kategorie Ph1–pozitivní MPS. JAK2 mutace se vyskytla ve 12 případech (15,58%). U 3 osob (3,90%) byla nalezena mutace CALR a pouze v 1 případě (1,30%) byl nález pozitivní u aberace MPL genu (viz. Tabulka 5).

Tabulka 5: Celkový počet pacientů s danou mutací, procentuální zastoupení.

Rok 2018		
Mutace	Počet	Procenta
Mutace neg.	53	68,83%
JAK2 poz.	12	15,58%
BCR-ABL poz.	8	10,39%
MPL gen poz.	1	1,30%
CALR poz.	3	3,90%
celkem	77	100

Zdroj: vlastní



Obrázek 11: Koláčový graf v procentech za rok 2018.

Zdroj: vlastní

#### 4.2.3 Data – rok 2019

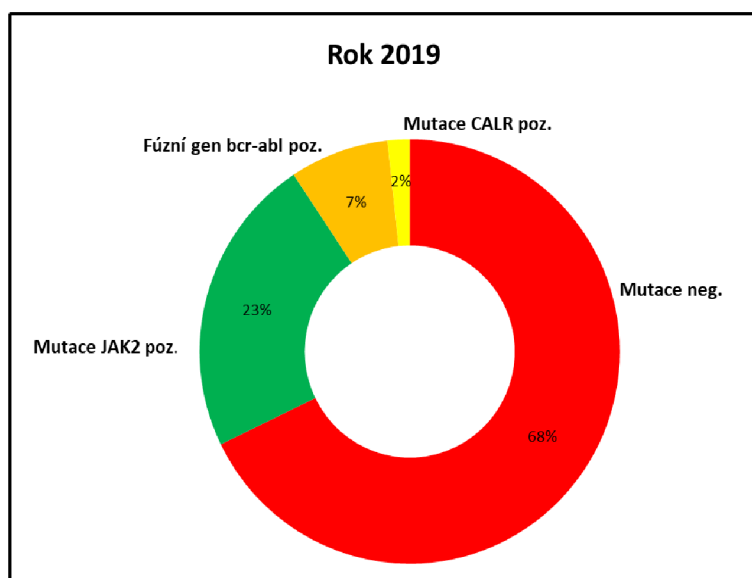
Za rok 2019 do laboratoře přišlo 118 vzorků podezřelých z diagnózy MPS. Negativní výsledek na jakoukoli z těchto mutací byl u 80 lidí (67,80%). Pozitivních pacientů

s prokázáním fúzního onkogenu BCR–ABL bylo 9 (7,63%). Mutace JAK2, která zásadně souvisí se vznikem MPS, se vyskytla ve 27 případech (22,88%) v tomto roce. A pouze u 2 pacientů (1,69%) se vyšetřením zjistila pozitivita na mutaci genu CALR. Také vidíme, že za celý rok nebyl potvrzen ani jeden případ s MPL aberace. Sepsaná data naleznete v Tabulka 6, která jsou graficky znázorněna na Obrázku 12.

Tabulka 6: Celkový počet pacientů s danou mutací, procentuální zastoupení.

Rok 2019		
Mutace	Počet	Procenta
Mutace neg.	80	67,80%
JAK2 poz.	27	22,88%
Fúzní gen poz.	9	7,63%
MPL gen poz.	0	0,00%
CALR poz.	2	1,69%
celkem	118	100

Zdroj: vlastní



Obrázek 12: Koláčový graf v procentech za rok 2019.

Zdroj: vlastní

#### 4.2.4 Mé výsledky – rok 2021

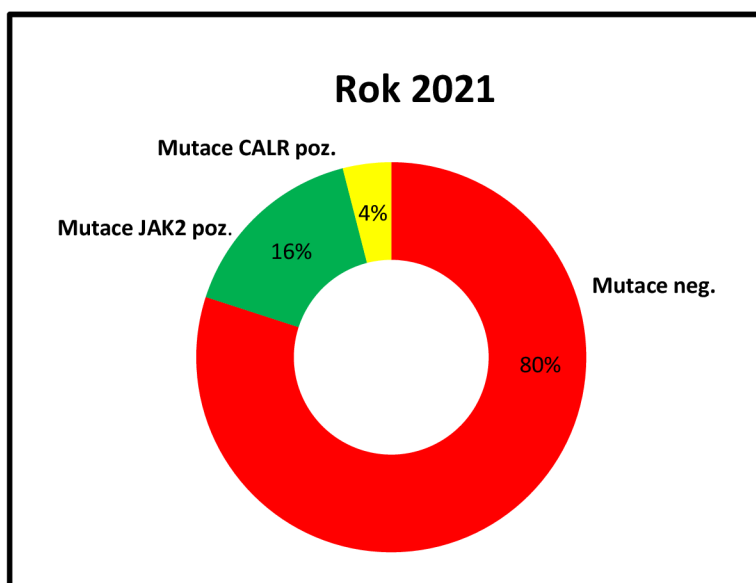
Měla jsem k dispozici celkem 25 vzorků od pacientů, kteří byli indikováni k vyšetření. Z celkového počtu bylo 20 (80%) negativních pacientů. U 4 osob (16 %) se prokázala mutace v genu JAK2. Pouze u jedné osoby (4%) se vyskytla inserce v genu CALR. Nikdo z pacientů nebyl pozitivní na mutaci MPL. Fúzní onkogen BCR–ABL jsem neprokazovala, proto je v tabulce proškrtnut. Když se podíváte do Tabulky 7, uvidíte, že

hodnoty relativních četností v roce 2021 jsou oproti předchozím letům zvýšené, hodnoty nejsou příliš přesné, jelikož byly vypočítány z malého množství dat.

Tabulka 7: Celkový počet pacientů s danou mutací, procentuální zastoupení.

Mé výsledky		
Mutace neg.	20	80%
JAK2 poz.	4	16%
CALR poz.	1	4%
BCR-ABL poz	/	/
MPL gen poz.	0	0%
celkem	25	100%

Zdroj: vlastní



Obrázek 13: Koláčový graf v procentech za rok 2021.

Zdroj: vlastní

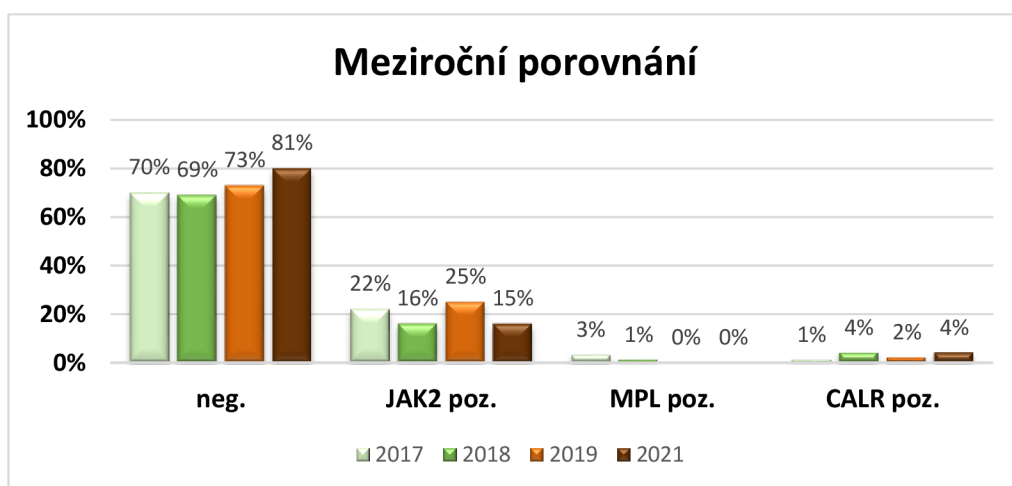
#### 4.2.5 Celkové výsledky

V Tabulce 8 jsou shrnuty kompletní součty dat za období od roku 2017–2019 a data získaná v roce 2021 při mé práci v laboratoři. Jsou zde uvedeny mutace s počty pacientů. Následují procenta vyjadřující relativní četnost výskytu dané mutace. Data jsou rozdělena na jednotlivé roky, které jsem poté sečetla, abych získala celkové hodnoty a mohla je v diskusi vyhodnotit a porovnat. Z této tabulky jsem vytvořila graf, který naleznete na Obrázku 14, kde můžete lépe vidět, že meziroční srovnání hodnot se u každé mutace pohybuje v přibližně stejné hladině.

Tabulka 8: Souhrn celkového období 2017–2021.

Rok	2017		2018		2019		2021		Celkem	
Mutace Ph-poz.	suma	%	suma	%	suma	%	suma	%	suma	%
BCR-ABL	13	12,15%	8	10,39%	9	8,26%	/	/	30	100%
Mutace Ph-neg.	suma	%	suma	%	suma	%	suma	%	suma	%
Tripl negativní	66	70,21%	53	68,83%	80	73,39%	20	81,48%	221	73,91%
JAK2	24	22,43%	12	15,58%	27	24,77%	4	14,81%	67	22,41%
MPL	3	3,19%	1	1,30%	0	0,00%	0	0,00%	4	1,34%
CALR	1	1,06%	3	3,90%	2	1,83%	1	3,70%	7	2,34%
<b>celkem</b>	<b>94</b>	<b>100%</b>	<b>69</b>	<b>100%</b>	<b>109</b>	<b>100%</b>	<b>25</b>	<b>100%</b>	<b>299</b>	<b>100%</b>

Zdroj: vlastní



Obrázek 14: Sloupcový graf, meziroční srovnání dat.

Zdroj: vlastní

#### 4.2.6 Porovnání výsledků

Pro objektivnost práce jsem zde zařadila ještě porovnání mých výsledků s vybranou studií od autora Ojeda et al., 2018. Studie byla vypracována ze souboru 439 osob argentinské populace v letech 2008–2016. Můj soubor obsahoval celkově 329 pacientů. Ovšem pacienti, kterým byla prokázána mutace BCR–ABL, byli zařazeni do jiné skupiny, a to do skupiny Ph–pozitivních osob. Při porovnání jsem pracovala pouze s pacienty vyšetřovanými na myeloproliferativní onemocnění, které patří do klasifikace Ph–negativních MPS. Pro porovnání, které naleznete v Tabulce 9, se tedy počet mých pacientů zúžil na 299. Z toho 221 pacientů bylo tripl negativních, počet odpovídá 73,91%. V porovnání s autorem, studie odhalila pouhých 10,70% negativních případů ke všem třem mutacím. Dále jsem u 67 pacientů, nebo-li 22,41% odhalila mutaci JAK2 genu, kdežto v argentinské studii se potvrdila u 74,90% lidí. Výsledky u CALR z mého výzkumu odpovídají 2,34%, tedy 7 pacientům. Ve studii bylo pozitivních k této mutaci 12,30%. MPL jsem prokázala u 1,34% lidí a studie jich odhalila 2,10%.

Tabulka 9: Porovnání výsledků relativních četností se studií.

Mutace	Můj výzkum		Argentinská studie	
	Osoby	Procenta	Osoby	Procenta
JAK2	67	22,41%	329	74,94%
CALR	7	2,34%	54	12,30%
MPL	4	1,34%	9	2,05%
Negativní	221	73,91%	47	10,71%
Celkem	299	100%	439	100%

Zdroj: vlastní

Pacienti, kteří byli vyhodnoceni negativně, zásadně ovlivnili výsledky výzkumu. Na základě toho jsem se rozhodla, že provedu ještě jedno porovnání, která naleznete v Tabulce 10, kde vyhodnotím pouze pacienty s mutací. Prokázaných 78 pozitivních případů z mého souboru jsem porovnávala s 392 pozitivními osobami ze studie. V mé práci mělo 67 lidí pozitivní nález mutace v JAK2 genu a to odpovídá 85,90%. Ve studii bylo na JAK2 pozitivní 329 pacientů tedy 83,93%. Mutace CALR se z mého souboru vyskytla u 7 lidí přepočítáno na procenta to je 8,97% v porovnání s výzkumem, kde bylo 54 pozitivních případů nebo-li 13,78%. A poslední aberace je MPL u které mi vyšli 4 pacienti pozitivní což je 5,13% a v jejich výzkumu bylo pozitivních 9 nebo-li 2,30%. V tomto porovnání by směrodatná odchylka u žádné z mých hodnot oproti jejich nepřekročila 3%.

Tabulka 10: Porovnání relativních četností mezi mutacemi.

Mutace	Můj výzkum		Argentinská studie		Směrodatná odchylka
	Osoby	Procenta	Osoby	Procenta	
JAK2	67	85,90%	329	83,93%	1%
CALR	7	8,97%	54	13,78%	3%
MPL	4	5,13%	9	2,30%	2%
Celkem	78	100%	392	100%	

Zdroj: vlastní

## 5. Diskuse

Má laboratorní práce byla založena na stanovení vzorků krve nebo kostní dřeně. Prováděla jsem detekci mutace JAK2 metodou PCR–ARMA a následnou elektroforézou PCR produktů. Mutaci MPL jsem detekovala metodou Real–time PCR. Výsledky byly přístrojem zaznamenávány v reálném čase. Změny v genu pro CALR jsem stanovovala pomocí fragmentační analýzy v přístroji, který taktéž zaznamenával výsledky ve formě píků, které jsem následně vyhodnocovala. Stejným způsobem byly také zpracovány i ostatní vzorky získané z databáze, které jsem využila k vytvoření statistiky.

Při vyhodnocení a mapování výsledků jsem pracovala pouze s Ph–negativními MPS, která jsou způsobená především bodovou mutací JAK2 a mutacemi v genech CALR a MPL, ale také mnoha dalšími, ne příliš častými mutacemi. Aberace fúzního genu BCR–ABL nám tuto diagnózu vyvrací, ale zařazena sem byla z toho důvodu, aby práce byla ucelená. protože klasifikace WHO rozděluje myeloproliferace na Ph–pozitivní a Ph–negativní.

Získaná data v porovnání s autorem Ojeda et al., 2018 se znatelně liší, a to zejména v procentech odhalených negativních případů. V mém výzkumu bylo víc jak 7/10 pacientů tripl negativní, kdežto v porovnání se zmiňovaným autorem, jehož výsledky zahrnovaly něco málo přes 1/10 lidí, kteří měli negativní nález u všech tří mutací. Tento trend byl v případě positivity u JAK2 mutace opačný. To znamená, že mé výsledky JAK2 mutace zahrnovaly více jak 2/10 pozitivních pacientů a ve studii bylo 7/10 osob s touto mutací. Dá se říci, že je otočený poměr hodnot mezi jejich a mými výsledky u negativních pacientů a u pacientů pozitivních na JAK2. Odchylna vznikla pravděpodobně tím, že jsem měla k dispozici soubor dat, který obsahoval takzvaně suspektní pacienty. To znamená, že těmto pacientům bylo lékařem indikováno vyšetření na základě suspekce = podezření. Kdežto soubor argentinské studie obsahoval pacienty s potvrzenou diagnózou MPS. V případě dalších dvou mutací, tj. MPL a CALR, jsme měli oba podobné výsledky, srovnatelné hodnoty. Nutno říci, že vzorky ve studii byly zpracovávány obdobnými metodami, jako ty v mé práci.

Výsledky negativních pacientů ovlivnily celé pozorování, proto jsem se rozhodla provést výpočet relativního rozložení četností pouze mezi mutovanými pacienty. Hodnoty, díky odstranění velkého počtu negativních pacientů se výrazně změnily a ve srovnání se studií byly shodné. Vypočítaná směrodatná odchylka mezi výsledky z mé práce a z výzkumu Ojeda et al., 2018 nebyla větší než 3%. Hodnoty jsou shodné nejen



s touto studií, ale i s dalšími zdroji, jako je například Kim et al., 2015, kteří ve svém souboru měli 67,3% pozitivních pacientů na JAK2 mutaci, 12,9% z nich vyšlo pozitivně na mutaci CALR a 3,5% mělo prokázáno mutaci MPL. Zbylých 18,1% osob vyšlo trojitě negativně. Každý, kdo vypracuje podobnou studii má jiný počet negativních případů, proto pokud bych tuto hodnotu ze studie opět vynechala a porovnávala jen rozložení mutací, získám následující: JAK2 80,8%, CALR 15% a MPL 4,2%. Nyní můžete vidět, že hodnoty jsou opět ve stejné hladině, jako ty v mé práci. Zmiňovaní autoři potvrzují mé výsledky při mapování. Také je ze získaných výsledků patrné, že distribuce řidičské mutace JAK2 několikanásobně převyšuje výskyt mutace MPL a CALR. Mutace trombopoetického receptoru MPL W515L/K má velmi nízkou frekvenci. O něco málo vyšší výskyt jsou v případě mutace genu CALR. Konkrétně je zjištěno, že mutace JAK2 je nejčastějším nálezem ať už se jedná o ET, kde bývá u 95% pacientů. Tak i u osob s PV či PMF se vyskytuje minimálně v polovině případů.

Původně jsem plánovala provést mapování také distribuce konkrétních typů myeloproliferativního onemocnění u každé z mutací. Neboli vyhodnotit kolik procent lidí trpících na ET, PV či PMF má mutaci JAK2, MPL, anebo CALR. Bohužel k takovému vyhodnocení jsem neměla potřebná data. Jelikož se jednalo o prvotní vyšetření suspektních pacientů, nebyly v jejich záznamech uvedeny finální diagnózy, ale pouze jejich předpoklad. V mnoha případech byla jako diagnóza uvedena pouze myeloproliferace bez větších specifikací. To znamená, že i kdybych se rozhodla provést statistiku pouze z podezření na diagnózu, měla bych téměř u poloviny osob menší datový soubor. Z tak malého počtu dat by byly statistické výsledky velmi nepřesné. Nicméně i takto provedené mapování má dostatečnou vypovídající hodnotu.

## 6. Závěr

Závěrem této práce bych ráda shrnula splnění mých cílů. V první teoretické části práce jsem se věnovala zejména myeloproliferativním onemocněním jako takovým. Byly zde uvedeny molekulárně genetické změny související s onemocněním, klasifikace MPS na Ph pozitivní a Ph negativní subtypy. Jednotlivé poddruhy byly detailně popsány. Jde o mutace, které jsou přímo zodpovědné za vznik myeloproliferativních syndromů. Uvedla jsem jejich epidemiologický výskyt, charakteristické symptomy, diagnostická kritéria, a také možnosti léčby. Ve druhé experimentální části práce jsem provedla genetické stanovení u pacientů podezřelých na myeloproliferativní onemocnění. Byly použity laboratorní metody pro izolace DNA, polymerační ARMS-PCR a detekční metoda PCR produktů v elektroforéze, dále RT-PCR nebo fragmentační analýzu. Veškeré vzorky byly zpracovány v genetické laboratoři v Nemocnici České Budějovice a.s. Díky dokumentaci výsledků v laboratorní interní systém LIS bylo možné získat potřebná data k výzkumu.

Provedla jsem statistické zpracování výsledků v programu Excel. Bylo potřeba data vyfiltrovat a vložit do tabulek. Následně jsem provedla mapování z hlediska zastoupení jednotlivých mutací. Dospěla jsem k závěru, že v celé skupině hematologických onemocnění je s nejvyšší frekvencí přítomna mutace JAK2. Další dvě mutace v genech CALR a MPL se vyskytly v menší míře, ale představují klíčový rys užitečný pro diagnostické, prognostické a terapeutické přístupy.

Kdybych měla vyhodnotit splnění svých cílů, které jsem si na začátku výzkumu zadala, vše se mi povedlo velmi dobře do práce zahrnout. Při jejich plnění jsem narazila na menší překážku při porovnávání výsledků, kterou si mi nakonec podařilo elegantně vyřešit. Statistické mapování se zdá být jednoduché, ale chce to zdatné schopnosti při práci s excelem a reflexivní myšlení.

Co se týče využitelnosti v praxi, začal se v současné době brát v potaz genetický profil pacienta, jako pomůcka při volbě vhodné léčby. Začaly se zohledňovat mutace nejen takzvané „řidičské“, o kterých se zde zmiňuji, ale také mutace subklonální. Kromě toho byly u pacientů s MPS objeveny další mutační změny, které jsou spojeny s horší prognózou. Jedná se například o mutaci ASXL1, která se zdá být mezi nimi nejhorší. V této problematice by se mohl skvěle uplatnit nový prognostický nástroj, kterým je metoda kvantifikace mutační zátěže alely za pomoci Real-time PCR, jenž se mimo jiné používá při hodnocení účinnosti terapie.

## 7. Seznam literatury

1. ADAM, Z. et al., 2001. *Hematologie II. Přehled maligních hematologických nemocí*. 1. vydání. Praha: Grada, 65–66 s. ISBN 978-80-7262-715-8.
2. ADAM, Z. et al., 2004. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Praha: Grada, 48 s. ISBN 80-247-0896-5.
3. ADAM, Z. et al., 2008. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2. vydání. Praha: Grada, 41–74 s. ISBN 978-80-247-2502-4.
4. ADAN, A. et al., 2017. *Flow cytometry: basic principles and applications, Critical Reviews in Biotechnology*. 37(2), 163–176, doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.
5. BIOPEdia © 2020. [online]. *Elektroforéza nukleových kyselin*. [cit. 2020–04–02]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/elektroforeza-nukleovych-kyselin>.
6. BIOPEdia © 2020. [online]. *Kvantitativna PCR (Real-time PCR)*. [cit. 2020–02–29]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/kvantitativna-pcr-real-time-pcr>
7. BUNEŠOVÁ, M., SKALICKÁ, A., 2008. *Pracovní postup preanalytická fáze laboratorního vyšetření* [datový soubor]. Praha: Česká asociace sester – Prezidium [cit. 2019–12–11]. Dostupné z: [http://www.cna.cz/docs/tiskoviny/cas\\_pp\\_2008\\_0001.pdf](http://www.cna.cz/docs/tiskoviny/cas_pp_2008_0001.pdf).
8. BRYCHTOVÁ, Y., 2007. *Primární myelofibróza*. [online]. Brno: FN. [cit. 2019–10–5] ISSN 2570-8791. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/myeloproliferativni-onemocneni/primarni-myelofibroza/>
9. CAMPR, V., Kačírková, P., 2007. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. 1. vydání. Praha: Grada, 1–10 s. ISBN 978-80-247-1853-8.
10. ČERVINEK, L. et al., 2014. *JAK2 inhibitory v léčbě primární myelofibrózy. Dodatek k doporučením pro diagnostiku a léčbu Ph negativních myeloproliferativních onemocnění České pracovní skupiny pro Ph negativní myeloproliferativní onemocnění České hematologické společnosti ČLS JEP (CZEMP)*. Vnitřní lékařství, Brno: Facta Medica. 60(2), 158–163. ISSN 1801-7592.

11. DOUBEK, M., 2009. *Esenciální (primární) trombocytémie*. [online]. FN Beno [cit. 2019–30–5]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/myeloproliferativni-onemocneni/esencialni-primarni-trombocytemie/>
12. DOUBEK, M., 2009. *Pravá polycytémie*. [online]. Brno: FN [cit. 2019–9–22] Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/myeloproliferativni-onemocneni/prava-polycytemie/>
13. DOUBEK, M., 2009. *Myeloproliferativní onemocnění*. [online]. Brno: FN [cit. 2019–9–12]. dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/myeloproliferativni-onemocneni/>
14. DULÍČEK, P., 2018. *Léčba pravé polycytemie*. proLékaře. 64(10), 955–960. ISSN 1803-6597.
15. FABER, E., RENATA, U., 2010. *Chronická myeloidní a chronická lymfatická leukemie*. Interní medicína pro praxi. 12(6), 321–324. ISSN 1803-5256.
16. GRINFELD, J. et al., 2018. *Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms*. [online]. Massachusetts Medical Society. 1416–1430 [cit. 2019–11–12]. dostupné z: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1716614>.
17. GARIBYAN L, AVASHIA N., 2014. *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Journal of investigative dermatology. 133(3), doi: 10.1038/jid.2013.1
18. HARWAY, T., HARWAY, E., 2005. *Flow cytometry*, Methods in Molecular Biology: Flow cytometry protocols. 65(2), 1–20. doi: 10.1080/00365510510013479.
19. HOŘEJŠÍ, V. et al., 2017. *Základy imunologie*. 6. vydání. Praha: Triton, 34–49 s. ISBN: 978-80-7553-250-3.
20. CHAN, Q. et al., 2007. *Amplification Refractory Mutation System, a Highly Sensitive and Simple Polymerase Chain Reaction Assay, for the Detection of JAK2 V617F Mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders*. Department of Pathology and Laboratory Medicine, 9(2), 272–276. doi: 10.2353/jmoldx.2007.060133.
21. CHLOBÁK, L., 2005. *Odkaz sira Williama Oslera*. Vnitřní lékařství. 51(1), 123–127. ISSN 1801-7592.

22. INDRÁK, K. et al., 2014. *Hematologie a transfúzní lékařství*. 1. vydání Praha: Triton, 1–78 s. ISBN 978-80-7387-722-4.
23. JAROŠOVÁ, M. et al., 2012. *Cytogenetika a molekulární cytogenetika v diagnostice a stanovení prognózy myeloproliferativních neoplázií*. *Onkologie*. 6(3), 152–157. ISSN 1803-5345.
24. KAČÍRKOVÁ, P., CAMPR, V., 2007. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. 1. vydání. Praha: Grada, 1–43 s. ISBN 978-80-247-6775-8.
25. KIM, S. Y. et al., 2015. *CALR, JAK2, and MPL Mutation Profiles in Patients With Four Different Subtypes of Myeloproliferative Neoplasms: Primary Myelofibrosis, Essential Thrombocythemia, Polycythemia Vera, and Myeloproliferative Neoplasm, Unclassifiable*. *American Journal of Clinical Pathology*. 143 (5), 635–644. doi: doi.org/10.1309/AJCPUAAC16LIWZMM
26. KŘÍSTKOVÁ, Z. et al., 2009. *Detekce mutace JAK2V617F u myeloproliferativních onemocnění – přehled a vlastní zkušenosti*. *Transfúze a hematologie dnes*. 15(3), 143–148. ISSN 1803-6597.
27. LEVINE, RL., GILLILAND, DG., 2008. *Myeloproliferative disorders*. *Blood*. 112(6), 2190. doi: 10.1182/blood-2008-03-077966.
28. LOOSOVÁ, J. et al., 2018. *Pracovní postup preanalytické fáze laboratorního vyšetření krve*. [datový soubor]. [cit. 2020–3–2]. Dostupné z: <https://www.nconzo.cz/file/742a62c0527209d37ff15a36d4ac4665518f6b2c>.
29. MARINOV, Iuri, 2008. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2. vydání. Praha: Triton, 19 s. ISBN: 978-80-7387-143-7.
30. MESCHER, Anthony, 2018. *Junqueirovy základy histologie*. Galén, 252 s. ISBN: 9788074923241.
31. MORGAN, K. J. GILLILAND, D. G., 2008. *A Role for JAK2 Mutations in Myeloproliferative Diseases*. *Annual Review of Medicine*, 59(1), 213–222. doi: 10.1146/annurev.med.59.061506.154159.
32. NANGALIA, J. et al., 2014. *Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2*. *NEJM*. 370(12), 2391–2405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542.
33. OJEDA, M. J. et al., 2018. *CALR, JAK2 and MPL Mutation Status in Argentinean Patients With BCR–ABL1– Negative Myeloproliferative Neoplasms*. *Hematology*. 23(4), 208–211. doi: 10.1080/10245332.2017.1385891.

34. OR, R., 2003. *Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukemia in first chronic phase*. Blood. 101(2), 441–445. doi: 10.1182/blood-2002-02-0535.
35. PECKA, M., 2006. *Laboratorní hematologie v přehledu*. 1. vydání. Nakladatelství Infiniti art, s.r.o., 256–261 s. ISBN 80-86682-01-3.
36. PENKA, M. et al., 2005. *Doporučený postup diagnostiky a terapie esenciální trombocytémie a trombocytémie provázející jiné myeloproliferativní choroby*. Vnitřní lékařství. 51(6), 742–747. ISSN 1801-7592.
37. ROUČKOVÁ, N., 2018. *Příloha č. 2 Seznam laboratorních vyšetření PHEM*. [datový soubor]. České Budějovice [cit. 2020–2–4]. Dostupné z: [http://www.nemcb.cz/upload/files/NCB\\_LKCHI\\_SME\\_15\\_001\\_P\\_\\_iloha\\_\\_\\_\\_2\\_C\\_LP\\_Seznam\\_labor\\_vy\\_\\_et\\_\\_eni\\_PHEM.pdf](http://www.nemcb.cz/upload/files/NCB_LKCHI_SME_15_001_P__iloha____2_C_LP_Seznam_labor_vy__et__eni_PHEM.pdf).
38. SCHEINOST, O., 2012. © NCB\_LMBG\_PP\_12\_065\_A *Izolace genomové DNA z plné krve (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood (Roche))*. Řízená dokumentace, Pracovní postup.
39. SCHEINOST, O., 2012. © NCB\_LMBG\_PP\_12\_031 *Základní obsluha sekvenátoru, analýza dat*. Řízení dokumentace, Pracovní postup.
40. SCHEINOST, O., 2013 © NCB\_LMBG\_SOP\_12\_032\_B *Stanovení mutace genu pro JAK 2 metodou ARMS PCR*. Řízená dokumentace, Standardní operační postup.
41. SCHEINOST, O., 2016 © NCB\_LMBG\_pP\_12\_111 *Příprava master mixů pro detekci mutací genu pro JAK 2 metodou ARMS PCR*. Řízená dokumentace, Pracovní postup.
42. SCHEINOST, O., 2016 © NCB\_LMBG\_PP\_16\_149\_A *Stanovení mutace genu pro CALR (fragmentační analýza)*. Řízená dokumentace, Pracovní postup.
43. SCHEINOST, O., 2017 © NCB\_LMBG\_PP\_16\_150\_B *Stanovení mutace MPL W515K, L (Ipsogen)*. Řízená dokumentace, Pracovní postup.
44. SCHWARZL, J. et al., 2011. *Diagnostika a léčba BCR/ABL-negativních myeloproliferativních onemocnění – principy a východiska doporučení CZEMP*. Vnitřní lékařství. 57(2), 189–213. ISBN 978-80-87109-19-9.
45. SOUČEK, M., 2011. *Vnitřní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada. 621–646 s. ISBN 978-80-247-2110-1.
46. SOUČKOVÁ, J., 2014. *Referenční rozmezí hematologických vyšetření*. [datový soubor] Pardubice: Pardubická krajská nemocnice, a.s. [cit. 2020–1–18].

Dostupné z: <http://pardubice.nempk.cz/sites/default/files/nemocnice-pardubice/obsah/oddeleni/hematologie/soubory/pkn-referencni-rozmezi-hem-vysetreni-2014.pdf>.

47. ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., 2008. *Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda 1. Část*. Hradec Králové: Univerzita obrany, katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví. [datový soubor]. Dostupné z: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:49FSefBP2NkJ:https://adoc.tips/download/zuzana-inkorova-lenka-zarybnicka-univerzita-obrany-katedra-rbde3ba9d49b53bfe51f2556910d0593310352.html+%&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-b-d>.
48. ŠTOURAČOVÁ, M., 2009 *Vyhodnocování a interpretace směsných forenzních vzorků fragmentační analýzou str polymorfismů v podmínkách akreditovaného procesu*. Brno. Bakalářská práce, 33–34.
49. TEFFERI, A. et al., 2007. *Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel*. *Blood*. 110(4), 1092–1097. doi: 10.1182/blood-2007-04-083501.
50. VAINCHENKER, W., CONSTANTINESCU SN., 2005. *A unique activating mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases*. *Hematology*. (1), 195–200. doi: 10.1182/asheducation-2005.1.195.
51. ŽÁČKOVÁ, D., 2012. *Chronická myeloidní leukemie, informace pro pacienty a jejich blízké*. 1. vydání. Brno. 18–34 s. ISBN 978-80-260-1828-5.

## 8. Seznam zkratek

<b>ARMS–PCR</b>	amplifikační refrakterní mutační systém–PCR
<b>ASCT</b>	alogenní transplantace kmenových buněk
<b>AST</b>	aspartátaminotransferáza
<b>CALR</b>	kalretikulin
<b>CD</b>	diferenciační skupina
<b>CML</b>	chronická myeloidní leukémie
<b>COS</b>	kosinus
<b>Diff</b>	diferenciální rozpočet leukocytů
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>EPO</b>	eritropoetin
<b>ERY</b>	erytrocyt
<b>ET</b>	esenciální trombocytémie
<b>FAM</b>	na ose y
<b>FGFR</b>	receptor růstového faktoru fibroblastů
<b>FSC</b>	přední rozptyl (forward scatter)
<b>Hb</b>	hemoglobin
<b>H2O</b>	voda
<b>IRI</b>	imunoregulační index
<b>JAK2</b>	Janus kináza 2
<b>K3EDTA</b>	draselná sůl etylendiaminotetraoctové kyseliny
<b>KO</b>	krevní obraz
<b>LD</b>	laktátdehydrogenáza
<b>MCV</b>	střední objem erytrocytu
<b>MCH</b>	průměrné množství Hb v buňce
<b>MCHC</b>	střední koncentrace Hb v erytrocytech
<b>MPL</b>	trombopoetický receptor
<b>MPS</b>	myeloproliferativní syndrom
<b>NK</b>	přirození zabijáci
<b>NKT</b>	přirození zabijáci T buňky
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>PK</b>	periferní krev
<b>PMF</b>	primární myelofibróza



<b>PV</b>	polycitemie vera
<b>RBCL</b>	lyzační roztok na červené krvinky
<b>RDW</b>	distribuční šíře erytrocytů
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>RT-PCR</b>	PCR v reálném čase
<b>SSC</b>	boční rozptyl (side scatter)
<b>TKI</b>	tirosinkinázový inhibitor
<b>TPO</b>	trombopoetin
<b>UV</b>	ultrafialové záření
<b>WBCL</b>	lyzační roztok na bílé krvinky
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace
<b>WT</b>	alela divokého typu

## 9. Přílohy

Tabulka 11: Seznam pacientů z roku 2017.

Rok 2017		
Vzorek	Materiál	Přítomnost mutace
1	krev	Mutace neg.
2	krev	Mutace neg.
3	krev	Mutace neg.
4	krev	Mutace neg.
5	krev	Mutace neg.
6	krev	Mutace neg.
7	krev	Mutace neg.
8	krev	Mutace neg.
9	krev	Mutace neg.
10	krev	Mutace neg.
11	krev	Mutace neg.
12	krev	Mutace neg.
13	krev	Mutace neg.
14	krev	Mutace neg.
15	krev	Mutace neg.
16	krev	Mutace neg.
17	krev	Mutace neg.
18	krev	Mutace neg.
19	krev	Mutace neg.
20	krev	Mutace neg.
21	krev	Mutace neg.
22	krev	Mutace neg.
23	krev	Mutace neg.
24	krev	Mutace neg.
25	krev	Mutace neg.
26	krev	Mutace neg.
27	krev	Mutace neg.
28	krev	Mutace neg.
29	krev	Mutace neg.
30	krev	Mutace neg.
31	krev	Mutace neg.
32	krev	Mutace neg.
33	krev	Mutace neg.
34	krev	Mutace neg.
35	krev	Mutace neg.
36	krev	Mutace neg.
37	krev	Mutace neg.
38	krev	Mutace neg.
39	krev	Mutace neg.
40	krev	Mutace neg.
41	krev	Mutace neg.

42	krev	Mutace neg.
43	krev	Mutace neg.
44	krev	Mutace neg.
45	krev	Mutace neg.
46	krev	Mutace neg.
47	krev	Mutace neg.
48	krev	Mutace neg.
49	krev	Mutace neg.
50	krev	Mutace neg.
51	krev	Mutace neg.
52	krev	Mutace neg.
53	krev	Mutace neg.
54	krev	Mutace neg.
55	krev	Mutace neg.
56	krev	Mutace neg.
57	krev	Mutace neg.
58	krev	Mutace neg.
59	krev	Mutace neg.
60	krev	Mutace neg.
61	krev	Mutace neg.
62	krev	Mutace neg.
63	krev	Mutace neg.
64	krev	Mutace neg.
65	DNA	Mutace neg.
66	krev	Mutace neg.
67	krev	Mutace JAK2 poz.
68	krev	Mutace JAK2 poz.
69	krev	Mutace JAK2 poz.
70	krev	Mutace JAK2 poz.
71	krev	Mutace JAK2 poz.
72	krev	Mutace JAK2 poz.
73	krev	Mutace JAK2 poz.
74	krev	Mutace JAK2 poz.
75	krev	Mutace JAK2 poz.
76	krev	Mutace JAK2 poz.
77	krev	Mutace JAK2 poz.
78	krev	Mutace JAK2 poz.
79	krev	Mutace JAK2 poz.
80	krev	Mutace JAK2 poz.
81	krev	Mutace JAK2 poz.
82	krev	Mutace JAK2 poz.
83	krev	Mutace JAK2 poz.
84	krev	Mutace JAK2 poz.
85	krev	Mutace JAK2 poz.
86	krev	Mutace JAK2 poz.
87	krev	Mutace JAK2 poz.
88	krev	Mutace JAK2 poz.

89	krev	Mutace JAK2 poz.
90	krev	Mutace JAK2 poz.
91	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
92	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
93	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
94	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
95	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
96	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
97	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
98	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
99	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
100	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
101	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
103	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
104	krev	Mutace MPL genu poz.
105	krev	Mutace MPL genu poz.
106	krev	Mutace MPL genu poz.
107	krev	Mutace CALR genu poz.

Zdroj: vlastní

Tabulka 12: Seznam pacientů z roku 2018.

Rok 2018		
Vzorek	Materiál	Přítomnost mutace
1	krev	Mutace JAK2 poz.
2	krev	Mutace JAK2 poz.
3	krev	Mutace JAK2 poz.
4	krev	Mutace JAK2 poz.
5	krev	Mutace JAK2 poz.
6	krev	Mutace JAK2 poz.
7	krev	Mutace JAK2 poz.
8	krev	Mutace JAK2 poz.
9	krev	Mutace JAK2 poz.
10	krev	Mutace JAK2 poz.
11	krev	Mutace JAK2 poz.
12	krev	Mutace JAK2 poz.
13	krev	Mutace neg.
14	krev	Mutace neg.
15	krev	Mutace neg.
16	krev	Mutace neg.
17	krev	Mutace neg.
18	krev	Mutace neg.
19	krev	Mutace neg.
20	krev	Mutace neg.
21	krev	Mutace neg.
22	krev	Mutace neg.
23	krev	Mutace neg.
24	krev	Mutace neg.
25	krev	Mutace neg.

26	krev	Mutace neg.
27	krev	Mutace neg.
28	krev	Mutace neg.
29	krev	Mutace neg.
30	krev	Mutace neg.
31	krev	Mutace neg.
32	krev	Mutace neg.
33	krev	Mutace neg.
34	krev	Mutace neg.
35	krev	Mutace neg.
36	krev	Mutace neg.
37	krev	Mutace neg.
38	krev	Mutace neg.
39	krev	Mutace neg.
40	krev	Mutace neg.
41	krev	Mutace neg.
42	krev	Mutace neg.
43	krev	Mutace neg.
44	krev	Mutace neg.
45	krev	Mutace neg.
46	krev	Mutace neg.
47	krev	Mutace neg.
48	krev	Mutace neg.
49	krev	Mutace neg.
50	krev	Mutace neg.
51	krev	Mutace neg.
52	krev	Mutace neg.
53	krev	Mutace neg.
54	krev	Mutace neg.
55	krev	Mutace neg.
56	krev	Mutace neg.
57	krev	Mutace neg.
58	krev	Mutace neg.
59	krev	Mutace neg.
60	krev	Mutace neg.
61	krev	Mutace neg.
62	krev	Mutace neg.
63	krev	Mutace neg.
64	krev	Mutace neg.
65	krev	Mutace neg.
66	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
67	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
68	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
69	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
70	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
71	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
72	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.

73	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
74	krev	Mutace MPL genu poz.
75	krev	Mutace CALR genu poz.
76	krev	Mutace CALR genu poz.

Zdroj: vlastní

Tabulka 13: Seznam pacientů z roku 2019.

Rok 2019		
vzorek	Materiál	Přítomnost mutace
1	krev	Mutace JAK2 poz.
2	krev	Mutace JAK2 poz.
3	krev	Mutace JAK2 poz.
4	krev	Mutace JAK2 poz.
5	krev	Mutace JAK2 poz.
6	krev	Mutace JAK2 poz.
7	krev	Mutace JAK2 poz.
8	krev	Mutace JAK2 poz.
9	krev	Mutace JAK2 poz.
10	krev	Mutace JAK2 poz.
11	krev	Mutace JAK2 poz.
12	krev	Mutace JAK2 poz.
13	krev	Mutace JAK2 poz.
14	krev	Mutace JAK2 poz.
15	krev	Mutace JAK2 poz.
16	krev	Mutace JAK2 poz.
17	krev	Mutace JAK2 poz.
18	krev	Mutace JAK2 poz.
19	krev	Mutace JAK2 poz.
20	krev	Mutace JAK2 poz.
21	krev	Mutace JAK2 poz.
22	krev	Mutace JAK2 poz.
23	krev	Mutace JAK2 poz.
24	krev	Mutace JAK2 poz.
25	krev	Mutace JAK2 poz.
26	krev	Mutace JAK2 poz.
27	krev	Mutace JAK2 poz.
28	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
29	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
30	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
31	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
32	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
33	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
34	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
35	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
36	krev	Fúzní gen BCR-ABL poz.
37	krev	Mutace neg.
38	krev	Mutace neg.

39	krev	Mutace neg.
40	krev	Mutace neg.
41	krev	Mutace neg.
42	krev	Mutace neg.
43	krev	Mutace neg.
44	krev	Mutace neg.
45	krev	Mutace neg.
46	krev	Mutace neg.
47	krev	Mutace neg.
48	krev	Mutace neg.
49	krev	Mutace neg.
50	krev	Mutace neg.
51	krev	Mutace neg.
52	krev	Mutace neg.
53	krev	Mutace neg.
54	krev	Mutace neg.
55	krev	Mutace neg.
56	krev	Mutace neg.
57	krev	Mutace neg.
58	krev	Mutace neg.
59	krev	Mutace neg.
60	krev	Mutace neg.
61	krev	Mutace neg.
62	krev	Mutace neg.
63	krev	Mutace neg.
64	krev	Mutace neg.
65	krev	Mutace neg.
66	krev	Mutace neg.
67	krev	Mutace neg.
68	krev	Mutace neg.
69	krev	Mutace neg.
70	krev	Mutace neg.
71	krev	Mutace neg.
72	krev	Mutace neg.
73	krev	Mutace neg.
74	krev	Mutace neg.
75	krev	Mutace neg.
76	krev	Mutace neg.
77	krev	Mutace neg.
78	krev	Mutace neg.
79	krev	Mutace neg.
80	krev	Mutace neg.
81	krev	Mutace neg.
82	krev	Mutace neg.
83	krev	Mutace neg.
84	krev	Mutace neg.

85	krev	Mutace neg.
86	krev	Mutace neg.
87	krev	Mutace neg.
88	krev	Mutace neg.
89	krev	Mutace neg.
90	krev	Mutace neg.
91	krev	Mutace neg.
92	krev	Mutace neg.
93	krev	Mutace neg.
94	krev	Mutace neg.
95	krev	Mutace neg.
96	krev	Mutace neg.
97	krev	Mutace neg.
98	krev	Mutace neg.
99	krev	Mutace neg.
100	krev	Mutace neg.
101	krev	Mutace neg.
102	krev	Mutace neg.
103	krev	Mutace neg.
104	krev	Mutace neg.
105	krev	Mutace neg.
106	krev	Mutace neg.
107	krev	Mutace neg.
108	krev	Mutace neg.
109	krev	Mutace neg.
110	krev	Mutace neg.
111	krev	Mutace neg.
112	krev	Mutace neg.
113	krev	Mutace neg.
114	krev	Mutace neg.
115	krev	Mutace neg.
116	krev	Mutace neg.
117	krev	Mutace CALR genu poz.
118	krev	Mutace CALR genu poz.

*Zdroj: vlastní*



## 10. Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma mutace JAK2 <sup>V617F</sup> .....	11
Obrázek 2: Charakteristické rysy fází CML.....	15
Obrázek 3: Obrázek 3: Schéma testu ARMS–PCR.....	27
Obrázek 4: Výsledek separace vzorků v agarózovém gelu.....	34
Obrázek 5: Genetický analyzátor ABI310 pro fragmentační analýzu.....	36
Obrázek 6: Pipetovací protokol se zápisem výsledků.....	37
Obrázek 7: Počítačem zaznamenané výsledky fragmentační analýzy.....	37
Obrázek 8: Výsledky měření pro mutaci MPL W515K.....	40
Obrázek 9: Výsledky měření pro mutaci MPL W515L.....	40
Obrázek 10: Koláčový graf v procentech za rok 2017.....	42
Obrázek 11: Koláčový graf v procentech za rok 2018.....	43
Obrázek 12: Koláčový graf v procentech za rok 2019.....	44
Obrázek 13: Koláčový graf v procentech za rok 2021.....	45
Obrázek 14: Sloupcový graf, meziroční srovnání dat.....	46

## 11. Seznam tabulek

Tabulka 1: Výsledky vyšetření JAK2 mutace.....	34
Tabulka 2: Výsledky vyšetření mutace v genu CALR.....	37
Tabulka 3: Výsledky vyšetření na mutaci v genu MPL.....	40
Tabulka 4: Celkový počet pacientů s danou mutací, procentuální zastoupení.....	42
Tabulka 5: Celkový počet pacientů s danou mutací, procentuální zastoupení.....	43
Tabulka 6: Celkový počet pacientů s danou mutací, procentuální zastoupení.....	44
Tabulka 7: Celkový počet pacientů s danou mutací, procentuální zastoupení.....	45
Tabulka 8: Souhrn celkového období 2017–2019.....	46
Tabulka 9: Porovnání výsledků relativních četností se studií.....	47
Tabulka 10: Porovnání relativních četností mezi mutacemi.....	47
Tabulka 11: Seznam pacientů z roku 2017.....	58
Tabulka 12: Seznam pacientů z roku 2018.....	60
Tabulka 13: Seznam pacientů z roku 2019.....	62