

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Adéla Rubešová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Detekce chromozómových změn
u nemocných s myelodysplastickým
syndromem se zaměřením na přestavbu
genu *MECOM***

Diplomová práce

Bc. Adéla Rubešová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: RNDr. Milena Holzerová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla RUBEŠOVÁ**
Osobní číslo: **R190614**
Studijní program: **N1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Detekce chromozómových změn u nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS) se zaměřením na přestavbu genu MECOM.**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Shromáždit přehled literárních údajů - prognosticky významné chromozómové změny u MDS.
2. Detekovat genetické změny u nemocných s MDS pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).
3. Sestavit soubor nemocných s přestavbou genu MECOM - práce s databází nemocných.
4. U nemocných s přestavbou genu MECOM detekovat translokačního partnera.
5. Vyhodnotit detekované chromozómové změny a srovnat s literárními údaji.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Rohoň P. (2016): Nové možnosti v léčbě vybraných hematologických onemocnění. Praha: Mladá fronta.
2. Lexová S. (2000): Hematologie pro zdravotní laboranty, 1. díl. IDVPZ Brno.
3. Penka M., Tesařová E. *et al.* (2011): Hematologie a transfúzní lékařství I. Grada.
4. Vardiman J. W. *et al.* (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114: 937-951.
5. Greenberg P. L. *et al.* (2012): Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120(12): 2454-2465.
6. Haferlach T. *et al.* (2014): Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28: 241-247.
7. Ridgeway J. A., Tinsley S. *et Kurtin* S. E. (2017): Practical Guide to Bone Marrow Sampling for Suspected Myelodysplastic Syndromes. *Journal of the advanced practitioner in oncology* 8(1): 29-39.
8. McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. (eds) (2016): ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). Karger Publishers.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Milena Holzerová, Ph.D.
Hemato-onkologická klinika

Datum zadání diplomové práce: 17. října 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje + SOUHRN

Jméno a příjmení autora: Bc. Adéla Rubešová

Název práce: Detekce chromozómových změn u nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS) se zaměřením na přestavbu genu *MECOM*

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: RNDr. Milena Holzerová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zaměřuje na problematiku jednoho z klonálních onemocnění krvetvorby, konkrétně na myelodysplastický syndrom, což je skupina heterogenních onemocnění s variabilními klinickými, morfologickými i cytogenetickými vlastnostmi postihující především starší pacienty, ale není vzácností i u pacientů mladšího věku.

Diagnostika tohoto onemocnění se opírá o řadu dnes již rutinních laboratorních vyšetření, mimo jiné i o cytogenetickou a molekulárně-cytogenetickou analýzu kostní dřeně. Pro většinu pacientů s tímto onemocněním je charakteristická přítomnost specifických chromozómových aberací a genových mutací, na jejichž základě lze predikovat vývoj onemocnění a indikovat léčebné postupy. Teoretická část diplomové práce tedy shrnuje obecné znalosti o myelodysplastickém syndromu a detailněji se zaměřuje na přestavbu genu *MECOM* a její klinický význam.

Experimentální část této práce pak popisuje jednotlivé kroky – zpracování kostní dřeně, analýzu metodami klasické cytogenetiky a molekulární cytogenetiky, zhodnocení a popis nalezených aberací v souladu s Mezinárodní nomenklaturou pro lidskou cytogenetiku (ISCN). Detailněji se zaměřuje na pacienty s detekovanou abnormalitou 3. chromozómu za využití fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s cílenou translokační sondou a metody komparativní genomové hybridizace na čipu (aCGH), které byly schopny detailněji charakterizovat jednotlivé aberace 3. chromozómu. V průběhu 20 let byly tyto aberace detekovány u 5 % pacientů s myelodysplastickým syndromem vyšetřených v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Nejčastějším typem aberace 3. chromozómu byly translokace a inverze, které byly vždy spojeny s přestavbou genu *MECOM*. V případě translokací byly nejčastějšími translokačními partnery stanoveny chromozómy 2, 3 a 21. Dále kromě analýzy přestaveb 3. chromozómu práce vyhodnocuje a srovnává frekvenci výskytu všech chromozómových změn detekovaných metodou klasické cytogenetiky, FISH a aCGH.

Klíčová slova: myelodysplastický syndrom, FAB klasifikace, WHO klasifikace, IPSS, gen *MECOM*, *MDS1-EVII*, gen *GATA2*, FISH, G-pruhování, mFISH, aCGH

Počet stran: 95

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification + SUMMARY

Author's first name and surname: Bc. Adéla Rubešová

Title: Detection of Chromosomal Changes in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS) with a Focus on *MECOM* Gene Remodeling

Type of thesis: master thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, UP Olomouc

Supervisor: RNDr. Milena Holzerová, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Abstract:

This master thesis is focused on the issue of one of the clonal diseases of hematopoiesis, specifically myelodysplastic syndrome, which is a group of heterogeneous diseases with variable clinical, morphological and cytogenetic characteristics affecting mainly older patients, but is not uncommon even in patients of younger age.

The diagnostic of this disease is based on a number of routine laboratory examinations, including cytogenetic and molecular-cytogenetic analysis of the bone marrow. Most patients with this disease are characterized by the presence of specific chromosomal aberrations and gene mutations, which can be used to predict the development of the disease and indicate specific treatment procedures. The theoretical part of the master thesis summarizes the general knowledge about myelodysplastic syndrome and focuses in more detail on the rearrangement of the *MECOM* and its clinical significance.

The experimental part of this work describes the individual steps – bone marrow processing, analysis by classical cytogenetics and molecular cytogenetics, evaluation and description of found aberrations in accordance with The International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). It focuses in more detail on patients with detected chromosome 3 abnormality using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with a targeted translocation probe and array comparative genomic hybridization (aCGH), which were able to characterize individual chromosome 3 aberrations in more detail. Within 20 years, these aberrations were detected in 5 % of patients with myelodysplastic syndrome examined in the Laboratory of Cytogenetics and Molecular Cytogenetics of the Department of Hemato-Oncology, Olomouc University Hospital. The most common types of chromosome 3 aberration were translocations and inversions, which were always associated with rearrangement of *MECOM* gene. In the case of translocations, chromosomes 2, 3 and 21 were determined as the most common translocation partners. Furthermore, in addition to the analysis of rearrangements of chromosome 3, the work evaluates and compares the frequency of all chromosomal changes detected by conventional cytogenetic analysis, FISH and aCGH.

Keywords: myelodysplastic syndrome, FAB classification, WHO classification, IPSS, gene *MECOM*, *MDS1-EVII*, gene *GATA2*, FISH, G-banding, mFISH, aCGH

Number of pages: 95

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího magisterského studia pod vedením RNDr. Mileny Holzerové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

.....

Bc. Adéla Rubešová

Chtěla bych mnohokrát poděkovat své vedoucí diplomové práce, paní RNDr. Mileně Holzerové, Ph.D. za její nesmírnou ochotu, čas, trpělivost, nespočet cenných rad a za poskytnutí potřebných studijních materiálů během celé doby vypracovávání mé diplomové práce. Další velké díky patří také celému kolektivu Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc za jejich ochotu mi pomoci, poradit, a také za příjemné pracovní prostředí. Tato práce byla podpořena studentským grantem IGA_LF_2021_001.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Hematopoéza	3
3.2 Myelodysplastický syndrom	5
3.2.1 Etiopatogeneze a epidemiologie	5
3.2.2 Klinický obraz.....	7
3.2.3 Diagnostika	8
3.2.4 Klasifikace a prognostické skórovací systémy	10
3.2.5 Léčba.....	17
3.2.6 Cytogenetické nálezy u pacientů s MDS	20
3.2.7 Molekulárně-genetické nálezy u pacientů s MDS	24
3.3 Gen <i>MECOM</i>	27
3.3.1 Gen <i>EVII</i>	30
3.3.2 Gen <i>MDS1</i>	31
3.3.3 Gen <i>GATA2</i>	32
4 MATERIÁL A METODY	33
4.1 Biologický materiál	33
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	33
4.2.1 Použité chemikálie	33
4.2.2 Použité soupravy	35
4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava	35
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	37
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	39
4.4.1 Kultivace a zpracování buněk kostní dřeně pro cytogenetická a molekulárně-cytogenetická vyšetření.....	39
4.4.2 Příprava, barvení cytogenetických preparátů pomocí G-pruhování, karyotypizace a vyhodnocení výsledků.....	40
4.4.3 Analýza buněčných preparátů pomocí metody FISH/mFISH	41
4.4.4 Fenol-chloroformová izolace DNA z fixovaných buněk kostní dřeně	46
4.4.5 Kvantifikace a stanovení kvality DNA	47
4.4.6 Zpracování a vyhodnocení vzorků DNA metodou aCGH.....	48

5	VÝSLEDKY	53
5.1	Prospektivní analýza 30 vzorků	53
5.1.1	Soubor 22 pacientů s prokázanou diagnózou MDS.....	55
5.2	Analýza celkového souboru 324 pacientů	56
5.3	Soubor pacientů s přestavbou dlouhých ramen 3. chromozómu	56
5.3.1	Základní charakteristika souboru.....	56
5.3.2	Výsledky klasické cytogenetické a molekulárně-cytogenetické (FISH/mFISH) analýzy 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu	57
5.4	Podrobnější analýza souboru 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu	62
5.4.1	Výsledky FISH analýzy s využitím cílené translokační sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF (MetaSystems)	62
5.4.2	Výsledky molekulárně-cytogenetické analýzy aCGH	64
5.5	Kazuistiky	72
6	DISKUZE	77
7	ZÁVĚR	83
8	LITERATURA	84

Seznam symbolů a zkratk

- aCGH – Array-Comparative Genomic Hybridization (komparativní genomová hybridizace na čipu)
- AML – akutní myeloidní leukémie
- BM – biologický materiál
- BSA – Bovine Serum Albumine (hovězí sérový albumin)
- CD znaky – Clusters of Differentiation
- CDR – Commonly Deleted Region
- CEP – označení pro centromerické sondy
- CFU – Colony Forming Unit (kolonie formující jednotka)
- CFU-E – kolonie formující jednotka pro erytroidní řadu
- CFU-GEMM – kolonie formující jednotka pro granulocytární, erytroidní, monocytární a megakaryocytární řadu
- CFU-GM – kolonie formující jednotka pro granulocytární a monocytární řadu
- CFU-Meg – kolonie formující jednotka pro megakaryocytární řadu
- CMML – chronická myelomonocytární leukémie
- CSF – Colony Stimulating Factor (kolonie stimulující faktor)
- Cy3 – Cyanine 3
- Cy5 – Cyanine 5
- DAPI – 4,6-diamidino-2-fenylindol
- dsDNA – Double-Stranded DNA (dvouřetězcová DNA)
- EBSS – Earle's Balanced Salt Solution
- EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
- FAB – francouzsko-americko-britská
- FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace
- FNOL – Fakultní nemocnice Olomouc
- G-CSF – Granulocyte Colony Stimulating Factor
- HMA – hypometylační agens
- HOK – hemato-onkologická klinika
- HSC – Hematopoietic Stem Cell (hematopoetická kmenová buňka)
- HSCT – Hematopoietic Stem Cell Transplantation (transplantace krvetvorných kmenových buněk)
- CHIP – Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (klonální hematopoéza neurčitého potenciálu)

IPSS – International Prognostic Scoring System (Mezinárodní prognostický skórovací systém)
IPSS-R – International Prognostic Scoring System Revised (Mezinárodní prognostický skórovací systém – revidovaný)
ISCN – International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Mezinárodní nomenklatura pro lidskou cytogenetiku)
IST – imunosupresivní terapie
KD – kostní dřev
LOH – Loss of Heterozygosity (ztráta heterozygosity)
LSI – Locus Specific Identifier (lokusově specifický)
MDS – myelodysplastickým syndrom
MDS-EB – myelodysplastický syndrom s excesem blastů
MDS-MLD – myelodysplastický syndrom s multilineární dysplazií
MDS/MPS – myelodysplasticko-myeloproliferativní onemocnění
MDS-RS-MLD – myelodysplastický syndrom s prstenčitými sideroblasty a multilineární dysplazií
MDS-RS-SLD – myelodysplastický syndrom s prstenčitými sideroblasty a unilineární dysplazií
MDS-SLD – myelodysplastický syndrom s unilineární dysplazií
MDS-U – neklasifikovatelný myelodysplastický syndrom
mFISH – mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace
PBS – Phosphate Buffered Saline
PK – periferní krev
RA – refrakterní anémie
RAEB – refrakterní anémie s přebytkem blastů
RAEB-t – refrakterní anémie s přebytkem blastů v transformaci
RARS – refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RCC – dětská refrakterní cytopenie
RCMD – refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií
RCMD-RS – refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií a prstenčitými sideroblasty
RCUD – refrakterní anémie s unilineární dysplazií
RN – refrakterní neutropenie
RPMI-1640 médium – Roswell Park Memorial Institute 1640 médium
RT – refrakterní trombocytopenie
SDS – Sodium Dodecyl Sulfate (dodecylsírán sodný)
sEPO – sérový erytropoetin
SNP – Single Nucleotide Polymorphisms

SSC – Saline-Sodium Citrate

ssDNA – Single-Stranded DNA (jednořetězcová DNA)

STE – Sodium Chloride-Tris-EDTA

t-MDS – Therapy-related MDS (terapií indukovaný myelodysplastický syndrom)

TE – Tris-EDTA

TF – transkripční faktor

TRIS – 2-amino-2-(hydroxymetyl)propan-1,3-diol

UPD – uniparentální dizomie

WCP – Whole Chromosome Painting

WHO – World Health Organization

WPSS – WHO classification-based Prognostic Scoring System

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schématické znázornění zjednodušené hematopoézy (upraveno dle Nobili *et al.*, 2016).

Obrázek 2: Zjednodušený léčebný algoritmus pacientů s myelodysplastickým syndromem (upraveno dle Malcovati *et al.*, 2013; Steensma, 2018).

Obrázek 3: Zastoupení nejčastějších cytogenetických abnormalit nalezených v kohortě 1080 pacientů s myelodysplastickým syndromem a prokázanými klonálními abnormalitami (upraveno dle Haase *et al.*, 2007; Giagounidis *et Haase*, 2013).

Obrázek 4: Zastoupení jednotlivých genových mutací v kohortě 944 pacientů s cytomorfoloogickým průkazem MDS pomocí sekvenování (NGS) 104 kandidátních genů (upraveno dle Haferlach *et al.*, 2014; Haferlach, 2019).

Obrázek 5: Souhrn 28 partnerských genů při translokacích genu *MECOM* (upraveno dle Wieser, 2016).

Obrázek 6: Zobrazení typických zlomových bodů u pacientů s $t(3;3)$ nebo $inv(3)$ (upraveno dle Gröschel *et al.*, 2014).

Obrázek 7: Architektura proteinu MDS1-EVI1 (160 kDa) a 135 kDa isoformy EVI1 kódované stejným lokusem genu *MECOM* (upraveno dle Wieser, 2007; Glass *et al.*, 2014).

Obrázek 8: Schématické znázornění normálních a balancovaně přestavěných 3. chromozómů analyzovaných FISH metodou s využitím translokační sondy XL $t(3;3)$ GATA2/*MECOM* DF (MetaSystems).

Obrázek 9: Zastoupení jednotlivých diagnóz v kohortě 17 pacientů s aberací 3. chromozómu.

Obrázek 10: Výskyt aberace 3. chromozómu izolovaně, s 1 přídatnou změnou či v rámci komplexního karyotypu vztažený k jednotlivým chromozomálním aberacím 3. chromozómu stanovených v kohortě 17 pacientů.

Obrázek 11: Zastoupení jednotlivých aberací 3. chromozómu v kohortě 17 pacientů.

Obrázek 12: Snímky výsledků FISH analýzy na interfázních jádrech a mitózách při využití sondy XL *MECOM* (MetaSystems) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu při 1000x zvětšení.

Obrázek 13: Snímky výsledků FISH analýzy na interfázních jádrech při využití sondy XL $t(3;3)$ GATA2/*MECOM* DF DF (MetaSystems) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu při 1000x zvětšení.

Obrázek 14: Snímky výsledků FISH analýzy na interfázních jádrech a mitózách při využití sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF DF (MetaSystems) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu při 1000x zvětšení.

Obrázek 15: Distribuce delecí v rámci 5. chromozómu identifikovaných aCGH analýzou u 6 pacientů s aberací 3. chromozómu.

Obrázek 16: Ztráta heterozygoty v oblasti 7q31.33q36.3 zahrnující gen *EZH2* detekovaná u pacienta M5 aCGH analýzou.

Obrázek 17: Detekované změny v oblasti dlouhého ramene 3. chromozómu u pacientek F3 (A), F4 (B) a F5 (C) pomocí aCGH analýzy.

Obrázek 18: Distribuce nebalancovaných přestaveb v rámci dlouhého ramene 3. chromozómu identifikovaných aCGH analýzou u 7 pacientů z kohorty 17 pacientů s detekovanou aberací 3. chromozómu.

Obrázek 19: Chromotripse postihující dlouhé rameno 3. chromozómu detekovaná u pacientky F1.

Obrázek 20: Zastoupení jednotlivých aberací 3. chromozómu po kompletizaci výsledků ze všech provedených analýz v kohortě 17 pacientů.

Obrázek 21: Výsledný karyotyp pacienta M4 stanovený mFISH analýzou (převzato z Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL).

Obrázek 22: Výstup z programu Agilent CytoGenomics zobrazující profil jednotlivých chromozómů s přídatnou či upřesňující aberací stanovených pomocí aCGH analýzy – pacient M4.

Obrázek 23: Výsledný karyotyp pacientky F1 stanovený mFISH analýzou (převzato z Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL).

Obrázek 24: Výstup z programu Agilent CytoGenomics zobrazující profil jednotlivých chromozómů s přídatnou či upřesňující aberací stanovených pomocí aCGH analýzy – pacientka F1.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Diagnostické přístupy využívané při stanovování diagnózy myelodysplastického syndromu (upraveno dle Malcovati *et al.*, 2013).

Tabulka 2: FAB (francouzsko-americko-britská) klasifikace myelodysplastického syndromu z roku 1982 (upraveno dle Bennett *et al.*, 1982; Čermák, 2013).

Tabulka 3: Srovnání původně užívaných klasifikací myelodysplastického syndromu – FAB, WHO 2001 a WHO 2008 (upraveno dle Čermák, 2013).

Tabulka 4: Recentní revize WHO klasifikace myelodysplastického syndromu z roku 2016 (upraveno dle Arber *et al.*, 2016; Trněný *et al.*, 2020).

Tabulka 5: Bodové hodnocení jednotlivých kritérií IPSS-R (Mezinárodní prognostický skórovací systém – revidovaný) pro MDS se znázorněným cytogenetickým skórovacím systémem ve spodní části tabulky (upraveno dle Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012).

Tabulka 6: Jednotlivé rizikové kategorie IPSS-R (Mezinárodní prognostický skórovací systém – revidovaný) pro MDS predikující zároveň celkové přežití a dobu do progresu AML u pacientů s MDS (upraveno dle Greenberg *et al.*, 2012).

Tabulka 7: Bodové hodnocení jednotlivých kritérií WPSS (WHO classification-based Prognostic Scoring System) pro MDS (upraveno dle Malcovati *et al.*, 2007).

Tabulka 8: Rizikové kategorie prognostického skórovacího systému založeném na WHO klasifikaci (WPSS) s prediktivními charakteristikami (upraveno dle Malcovati *et al.*, 2007).

Tabulka 9: Nejčastější chromozómové aberace vyskytující se u pacientů s MDS a geny pravděpodobně zapojující se v patogenezi tohoto onemocnění (upraveno dle Vardiman *et al.*, 2009; Čermák, 2013; Malcovati *et al.*, 2013; Shallis *et al.*, 2018).

Tabulka 10: Nejběžnější geny zasažené somatickými mutacemi u pacientů s MDS (upraveno dle Pellagatti *et Boultwood*, 2015; Valent *et al.*, 2017; Shallis *et al.*, 2018; Caponetti *et Bagg*, 2020).

Tabulka 11: Složení Digestion Master Mixu.

Tabulka 12: Průběh Restriction Agilent programu v termocykléru.

Tabulka 13: Složení Labeling Master Mixu pro fluorescenční značení DNA.

Tabulka 14: Průběh Labeling Agilent aCGH programu v termocykléru.

Tabulka 15: Složení Hybridization Master Mixu.

Tabulka 16: Základní charakteristika a výsledky mnou provedené FISH analýzy 30 vzorků.

Tabulka 17: Základní charakteristika souboru 17 pacientů s aberacemi 3. chromozómu zároveň doplněná o výsledky klasické cytogenetické analýzy a metody FISH/mFISH.

Tabulka 18: Shrnutí jednotlivých přestaveb 3. chromozómu po FISH/mFISH analýze a po FISH s využitím translokační sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF DF.

Tabulka 19: Souhrn přínosů jednotlivých analýz provedených na kohortě 17 pacientů s aberací 3. chromozómu.

Tabulka 20: Zpřesnění jednotlivých přestaveb 3. chromozómu po klasické cytogenetické analýze, FISH/mFISH a po aCGH analýze.

Tabulka 21: Výsledky aCGH analýzy u souboru 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu zapsané dle nomenklatury ISCN.

1 Úvod

Myelodysplastický syndrom (MDS) je souhrnný název pro hematologické malignity charakteristické klonální poruchou medulární krvetvorby, periferní cytopenií v jedné nebo více vývojových krvetvorných řadách, neefektivní krvetvorbou myeloidní řady a velmi odlišnou prognózou. Jedná se o onemocnění s variabilními klinickými, morfologickými i cytogenetickými vlastnostmi, což velmi znesnadňuje diagnostiku tohoto onemocnění. Vzhledem k vyšší incidenci u starších lidí a stále stárnoucí populaci se předpokládá nadále narůstající prevalence tohoto onemocnění. Pacienti s MDS jsou ohroženi nejen komplikacemi spojenými s cytopeniemi, ale zároveň zhruba u 1/3 pacientů s MDS dochází k progresi do akutní myeloidní leukémie (Neuwirtová, 2005; Červinek, 2015). Je tedy žádoucí dosáhnout jasnějšího pochopení etiopatogeneze tohoto onemocnění a odhalit spojitosti se vznikem a jeho dalším vývojem. Zároveň vysoký věk pacientů při diagnóze je v mnoha případech spojen s dalšími nežádoucími komorbiditami, které negativně ovlivňují léčbu a prognózu těchto pacientů.

Díky rozvoji moderních metod cytogenetiky a molekulární genetiky je možno detekovat unikátní genetické změny u jednotlivých pacientů, což je využíváno při diagnostice, stratifikaci a volbě léčby. Jedním z takových nálezů nejen u pacientů s MDS může být alterace komplexního lokusu *MECOM*, který je alterován u pacientů s MDS poměrně vzácně, ale s o to horší prognózou je spjat. Hlubší poznání spojitostí nejen této alterace by mohlo vést k rozvoji cílenějších léčebných postupů, ale také k lepšímu pochopení etiopatogeneze tohoto onemocnění.

2 Cíle práce

- Shromáždění dostupných literárních údajů a vypracování literární rešerše o myelodysplastickém syndromu a prognosticky významných chromozómových změnách spjatých s MDS.
- Praktická část zaměřena na detekci genetických změn u nemocných s MDS pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s následným zpřesněním a dohledáním případných dalších genetických změn komparativní genomovou hybridizací na čipu (aCGH).
- Sestavení souboru nemocných s přestavbou genu *MECOM* a jeho následné statistické zhodnocení a porovnání s dosud publikovanými daty.
- Detekce translokačního partnera u analyzovaného souboru nemocných s přestavbou genu *MECOM*.
- Srovnání detekovaných chromozómových změn s literárními údaji.

3 Literární přehled

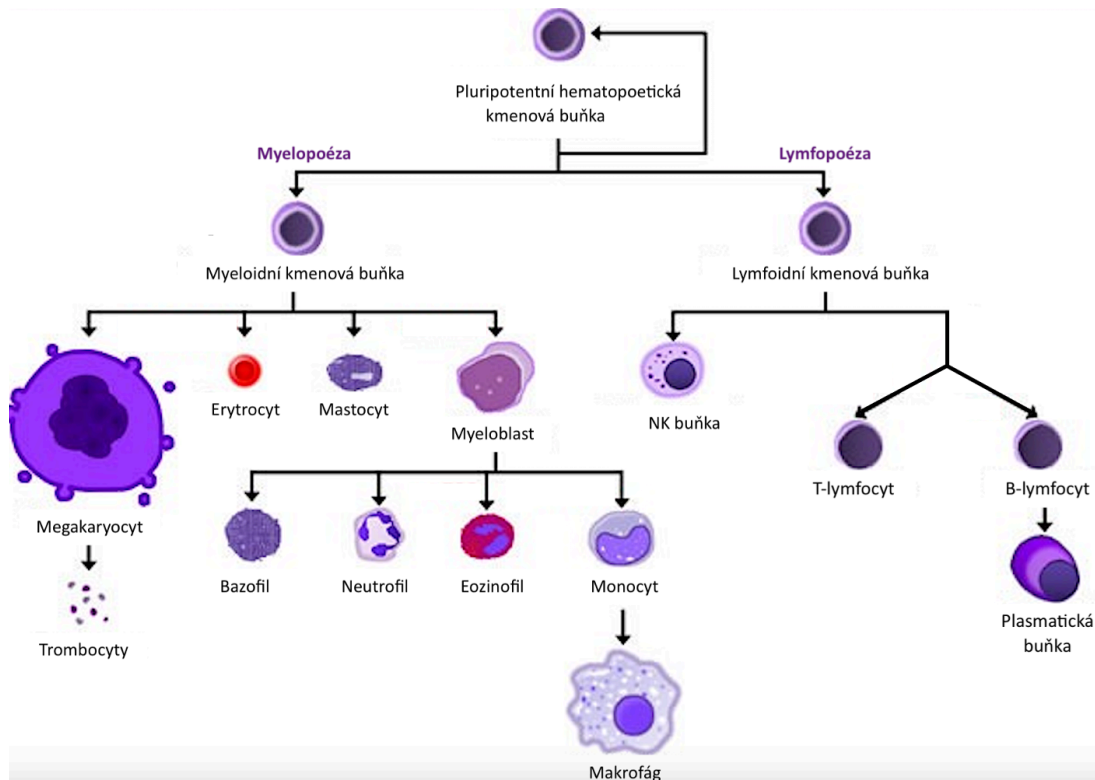
3.1 Hematopoéza

Hematopoéza neboli krvetvorba je přísně regulovaný proces vzniku, maturace a uvolňování zralých krevních elementů do krevního oběhu. Dle místa a vývojového období se krvetvorba člení do 3 základních fází – mezoblastová, hepatální a medulární s lymfoidní maturací v přídatných hematopoetických orgánech (uzliny, slezina či brzlík). Mezoblastová fáze hematopoézy probíhá ve žloutkovém vaku asi do 10. týdne prenatalního věku a je charakteristická hlavně tvorbou krevních elementů erytroidní řady. Poté dochází k přesunu hematopoézy převážně do jater a v menší míře i do sleziny (hepatální fáze), kdy po 20. týdnu prenatalního věku přebírá hematopoetickou aktivitu hlavní hematopoetický orgán, a to kostní dřev (medulární fáze) s následným ústupem hepatolienální krvetvorby (Penka, 1996; Buliková, 2000; Novotný *et al.*, 2011; Pavlová *et al.*, 2013; Juráňová *et Faber*, 2015).

Postnatální reaktivace hematopoézy nelymfoidních krevních elementů ve výše zmíněných přídatných hematopoetických orgánech (tzv. extramedulární hematopoéza) značí patologický stav charakteristický pro různá hematologická onemocnění (Novotný *et al.*, 2011; Pavlová *et al.*, 2013).

U adultních jedinců probíhá hematopoéza za fyziologických podmínek pouze v červené kostní dřev (hlavně plochých kostí) a lymfoidní maturace v přídatných lymfatických orgánech. Tento proces dává vzniknout jak erytrocytům, tak i trombocytům a veškerým druhům leukocytů. Všechny tyto krevní elementy vznikají ze společné pluripotentní kmenové buňky (HSC – hematopoietic stem cell), která se dále asymetricky dělí – jedna z dceřiných buněk podléhá sebeobnově v pluripotentní kmenovou buňku, zatímco druhá se dále diferencuje do zralých krevních buněk (viz Obrázek 1 níže). Díky tomuto asymetrickému dělení se v kostní dřev (KD) udržuje stálý počet pluripotentních hematopoetických kmenových buněk (Novotný *et al.*, 2011; Pavlová *et al.*, 2013; Juráňová *et Faber*, 2015). Druhé dceřiné buňky dávají vzniknout 2 možným multipotentním progenitorovým kmenovým buňkám, a to myeloidním (tzv. CFU-GEMM – kolonie formující jednotka pro granulocytární, erytroidní, monocytární a megakaryocytární řadu) a lymfoidním. Ty dále proliferují do buněk prekurzorových (u myeloidní řady označované jako další CFU odpovídajících vývojových řad – CFU-E, CFU-GM a CFU-Meg), které se následně diferencují přes několik dalších prekurzorových a blastických stádií do definitivně diferencovaných krevních buněk. Lymfoidní multipotentní progenitor dává vzniknout během lymfopoézy zralým B-lymfocytům, T-lymfocytům

a NK buňkám. Během myelopoézy vznikají zralé erythrocyty, granulocyty (bazofily, eozinofily a neutrofil), monocyty a nejspíše i dendritické buňky z multipotentního CFU-GEMM progenitoru – Obrázek 1 níže (Buliková, 2000; Pavlová *et al.*, 2013; Juráňová *et Faber*, 2015). Jednotlivá vývojová stádia krevních buněk disponují charakteristickými typy buněčných markerů, tzv. CD znaky (clusters of differentiation), které jsou využívány pro separaci a analýzu jednotlivých populací těchto buněk metodou imunofenotypizace (Penka, 1996; Novotný *et al.*, 2011; Pavlová *et al.*, 2013).



Obrázek 1: Schématické znázornění zjednodušené hematopoézy (upraveno dle Nobili *et al.*, 2016).

Jak již bylo v úvodu této podkapitoly zmíněno, hematopoéza je přísně regulovaný proces, na jejíž regulaci se podílí nespočet vnitřních (buněčná exprese specifických transkripčních faktorů, inhibitorů buněčného cyklu, zastoupení receptorů pro příjem hematopoetických růstových faktorů) a vnějších faktorů (dřeňové mikroprostředí, mezibuněčná komunikace a přítomnost celé řady růstových faktorů – interleukiny, erythropoetin, trombopoetin, kolonie stimulující faktory – CSF a další). Pro terapeutické účely mnohých hematologických onemocnění, které jsou zapříčiněny právě aberantní expresí těchto růstových faktorů, jsou některé z nich připravovány rekombinantně a následně suplementovány pacientovi (např. erythropoetin atd.) (Novotný *et al.*, 2011; Pavlová *et al.*, 2013).

Správná hematopoéza a funkčnost krevních elementů je nesmírně důležitá pro zachování životně důležitých funkcí (zprostředkování imunitní a hemokoagulační funkce, transport

kyslíku, živin, metabolitů, odpadních látek, iontů atd.). Poruchy krvevorbby a vznik patologických krevních elementů je příčinou mnohých hematologických onemocnění. Proto mezi další přístupy léčby různých hematologických onemocnění patří také autologní či alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) využívající vlastností HSC, které jsou schopny migrovat z krevního oběhu a usídlvat se (tzv. homing) v kostní dřeni (Pavlová *et al.*, 2013).

3.2 Myelodysplastický syndrom

První zmínky o sjednocujícím termínu pro heterogenní skupinu klonálních poruch krvevorbby, tedy myelodysplastickým syndromu (MDS), se objevují v roce 1976, kdy FAB (francouzsko-americko-britská) mezinárodní hematologická skupina pro klasifikaci leukémií navrhuje označení dysmyelopoetický syndrom, který by měl být užíván u pacientů nad 50 let s méně akutní myeloidní leukémií (AML), kteří nevyžadují okamžité zahájení terapie a mají méně než 30 % blastů v kostní dřeni a zároveň mají různě trvající příznaky. Tento syndrom FAB hematologická skupina rozdělila do 2 podtypů, a to na refrakterní anémii s přebytkem blastů (RAEB) a chronickou myelomonocytární leukémií (CMML). O 6 let později tato odborná skupina hematologů představuje systematičtější rozdělení myelodysplastického syndromu do 5 podtypů (tzv. FAB klasifikace viz níže) (Bennett *et al.*, 1976; Bennett *et al.*, 1982). Tato FAB klasifikace byla standardně užívána pro diagnostiku přibližně dalších 20 let a vychází z ní i dnes užívaná WHO klasifikace.

Před zavedením názvu myelodysplastický syndrom byly shodující se patologické stavy pacientů označovány za oligoblastickou leukémií, subakutní leukémií, preleukémií či doutnající leukémií, což odráželo riziko zvratu MDS do akutní leukémie, ke kterému, jak se později zjistilo, nedochází tak často. Nový název byl proto vhodnější volbou a také více charakterizuje základní vlastnosti tohoto onemocnění (dysplastickou morfologii krevních elementů vedoucí k insuficientní krvevorbě) (Rheingold *et al.*, 1963; Bennett *et al.*, 1976; Neuwirtová, 2005; Vondráková, 2010).

3.2.1 Etiopatogeneze a epidemiologie

MDS patří mezi klonální poruchy krvevorbby (patologické klony pochází ze stejné růstově zvýhodněné kmenové hematopoetické buňky) a lze ho rozdělit dle etiologie na primární a sekundární (pouze asi 10 % všech MDS). U primárního MDS není zcela objasněna příčina vzniku onemocnění (vzniklo *de novo*), zatímco u sekundárního MDS je etiologie známá –

příčinou je poškození DNA po předchozí terapii odlišné onkologické malignity (cytotoxická chemoterapie či radioterapie), tzv. terapií indukovaný (t-MDS), nebo po dlouhodobé expozici určitým látkám – benzenu, pesticidům, ropným produktům a dalším (Krahulcová, 2000; Málek, 2005; Neuwirtová, 2005; Krejčí *et al.*, 2008; Barzi *et al.*, 2010; Vondráková, 2010; Vondráková *et al.*, 2015).

Patogeneze hematologických malignit se chápe jako vícestupňový komplexní proces, jehož podstata není zcela známa. Pokroky v identifikaci chromozomálních aberací a genových alterací nám však poskytly určité nové poznatky o patogenezi těchto onemocnění. Má se za to, že je potřeba 2 klíčových zásahů v genomu hematopoetické buňky. První, který vede k tzv. premaligním změnám v hematopoetické kmenové buňce, je následován druhým zásahem (v průběhu klonální a subklonální expanze) vedoucím k dalším vývojovým změnám v mateřském patologickém klonu, který končí jeho maligní transformací (podobně jako je tomu i u jiných nádorových onemocnění) (Krejčí *et al.*, 2008; Vondráková, 2010; Čermák, 2013; Genovese *et al.*, 2014; Ganguly *et al.*, 2018).

Iniciální mutace v kmenové hematopoetické buňce, která je zapříčiněna ať už genetickými či environmentálními faktory, vede k tvorbě patologického klonu s abnormální proliferací a aktivitou (tzv. růstové zvýhodnění klonu) a případně iniciuje i defektní imunitní odpověď v podobě apoptózy zralejších forem krevních elementů (autoimunitní odpověď). Důsledkem těchto procesů je akumulace abnormálních či nezralých stádií myeloidních buněk (tzv. blastů) v KD (hypercelulární KD) a útlak zdravé krvetvorby, jehož důsledkem je cytopenie projevující se v periferní krvi (Krahulcová, 2000; Málek, 2005; Neuwirtová, 2005; Krejčí *et al.*, 2008; Čermák, 2013; Čermák, 2016). Genetická nestabilita tohoto klonu, spojená se změnou aktivity telomer/telomerázového komplexu, vede k dalším mutacím postihujícím jak onkogeny (stimulace proliferace patologického klonu s poruchou další diferenciací časných prekurzorů), tak i tumor supresorové geny (ztráta určité regulační funkce), což vyústí v celkovou dysregulaci hematopoézy a může nakonec mít za následek až progresi MDS do AML, k čemuž dochází zhruba u 25–30 % pacientů. Stěžejní příčinou úmrtí však ale u těchto pacientů bývají spíše komplikace spojené s neefektivní hematopoézou (až u 65 % pacientů) než progresi do AML (Michalová, 1999; Krahulcová, 2000; Krejčí *et al.*, 2008; Čermák, 2013; Valent *et al.*, 2017; Trněný *et al.*, 2020).

Je ale potřeba také zmínit, že nedochází pouze ke genetickým alteracím, ale genová exprese může být regulována také epigenetickými mechanismy (např. hypermetylací promotorových oblastí, což vede k umlčení odpovídajícího genu), které hrají velmi významnou

roli. Vzniklé epigenetické alterace jsou terapeuticky reverzibilní, proto jsou při takových typech mutací často epigenetické modifikátory využívány jako terapeutické cíle (např. 5-azacytidin jako terapeutikum u pokročilejších forem MDS) (Shih *et al.*, 2012; Kadlčková *et Rohoň*, 2014; Červínek, 2015; Čermák, 2016).

MDS patří do skupiny onemocnění vyššího věku (medián věku pacientů při diagnóze tohoto onemocnění osciluje kolem 70 let) s nepatrnou predominancí výskytu u mužů, s výjimkou tzv. 5q- syndromu, který je častější u žen (Krahulcová, 2000; Hofmann *et Koeffler*, 2005; Málek, 2005; Krejčí *et al.*, 2008; Barzi *et Sekeres*, 2010; Vondráková *et Rohoň*, 2015). Incidence tohoto onemocnění se pohybuje v průměru kolem 4,5 nemocných/100 000 obyvatel ročně. Incidence MDS však přímo úměrně koreluje se stářím populace, proto u obyvatel mladších 40 let je incidence pouze 0,5–1 nemocný/100 000 obyvatel ročně (vzácný výskyt). Naopak u obyvatel starších 60 let je incidence na 100 000 obyvatel nejméně 15–30x vyšší (15/100 000/rok) oproti incidenci MDS ve skupině obyvatel mladších 40 let (Trněný *et al.*, 2020). Častější výskyt MDS je také u pacientů trpících určitým dědičným onemocněním např. Downovým syndromem, Fanconiho anémií, Diamond-Blackfanovým syndromem, Bloomovým syndromem apod. (Barzi *et Sekeres*, 2010; Kissová, 2011).

Zvýšenou incidenci MDS u starších pacientů je možné také vysvětlit přítomností procesu stárnutí krvetvorby, který vede k akumulaci mutací, převaze myeloidní krvetvorby (tzv. myeloid bias), zvýšené produkci prozánětlivých stimulů, zvýšenému oxidačnímu stresu (potenciace mutagenity) a stoupající frekvenci tvorby klonální hematopoézy neurčitěho potenciálu (tzv. CHIP – premaligní somatické mutace asociované hlavně s geny *DNMT3A*, *ASXL1* a *TET2* podílejících se i při rozvoji hematologických malignit), která je rizikovým faktorem nejen pro progresi MDS, ale i pro jiná onemocnění (Genovese *et al.*, 2014; Jaiswal *et al.*, 2014; Porto *et al.*, 2015; Chung *et Park*, 2017; Valent *et al.*, 2017; Ganguly *et al.*, 2018).

Délka přežití se liší dle podtypu onemocnění a přítomných cytogenetických změn od několika měsíců až po řadu let. Zároveň se celkové přežití zkracuje s nástupem dalšího vývoje patologického klonu v průběhu onemocnění, k čemuž dochází asi u 12–39 % všech pacientů s diagnózou MDS (Hofmann *et Koeffler*, 2005; Schanz *et al.*, 2018).

3.2.2 Klinický obraz

Pro tento typ onemocnění není popsán žádný specifický klinický projev, který by jasně poukazoval na diagnózu MDS. Toto onemocnění může probíhat v počáteční fázi asymptomaticky (asi u 50 % pacientů) (Málek, 2005) a záchyt může být tedy náhodný při jakémkoliv provedeném vyšetření krevního obrazu (prevence, předoperační vyšetření atd.).

Nebo probíhá symptomaticky a nespecifické klinické projevy jsou následky dysplastických změn krvetvorných buněk v KD a přítomné periferní cytopenie (v jedné či více krvetvorných řadách dle toho, které hematopoetické buňky jsou postiženy). K nejčastějším příznakům tohoto onemocnění patří anémie, kdy u cca 80 % pacientů se koncentrace hemoglobinu pohybuje pod 100 g/l (fyziologické hodnoty jsou u mužů v rozmezí 136–176 g/l a u žen 120–168 g/l). Mezi projevy anémie a s ní souvisejícího anemického syndromu patří: únava, dušnost, bledost, fyzická slabost, závratě, bolesti hlavy, palpitace a stenokardie. Mezi další příznaky projevující se asi u 25–30 % pacientů patří projevy nespecifické imunodeficiency, tedy náchylnost k častým infekcím spojená s granulocytopenií. Krvácivé projevy a tvorba hematomů je spojena s trombocytopenií, která postihuje asi 10 % pacientů s MDS. Až u 15 % pacientů s MDS dochází k autoimunitním projevům jako je revmatoidní artritida, perikarditida, pleuritida, Sweetův syndrom, neuropatie a další. Splenomegalie není typickým symptomem MDS, ale může se výjimečně objevit u pacientů s CMML. (Málek, 2005; Krejčí *et al.*, 2008; Barzi *et al.*, 2010; Vondráková, 2010; Kisoová, 2011; Vondráková *et al.*, 2015; Trněný *et al.*, 2020).

Klinické projevy MDS jsou tedy velmi rozmanité a mohou se prolínat díky možné kombinaci výše zmíněných cytopenií. Zároveň jsou tyto projevy nespecifické a shodují se s klinickými projevy jiných interních onemocnění, což velmi ztěžuje diagnostiku tohoto onemocnění (Valent *et al.*, 2017).

3.2.3 Diagnostika

Diagnóza MDS by měla být zvažována u každého pacienta s nevysvětlitelnou cytopenií nebo s ní souvisejícími klinickými projevy (anemický syndrom, časté infekce či krvácivé projevy) (Vondráková, 2010; Killick *et al.*, 2014). Díky těmto rozmanitým nespecifickým klinickým projevům, které mohou poukazovat i na jiná onemocnění, je při diagnostice myelodysplastického syndromu v první řadě důležité vyloučit ostatní diferenciální diagnózy (v tomto kroku je zásadní podrobná znalost pacientovy anamnézy a fyzikální vyšetření pacienta s následnými laboratorními vyšetřeními) a poté zohlednit veškerá splněná diagnostická kritéria pro MDS (Vondráková, 2010; Malcovati *et al.*, 2013; Valent *et al.*, 2017). Diagnostikovat myelodysplastický syndrom je velmi komplexní krok zahrnující celou řadu laboratorních vyšetření pro potvrzení či vyvrácení této diagnózy. Diagnostika tohoto onemocnění je založena především na nálezech v krevním obraze (dysplastické změny a zastoupení jednotlivých krevních buněk), konfirmačním vyšetření KD trepanobiopsií (posouzení dřevňové buněčnosti

a fibrózy) a ze sternální punkce. Aspirát kostní dřeně je podroben morfoloickému, cytochemickému (průkaz prstenčitých sideroblastů atd.) a cytogenetickému vyšetření, případně i imunofenotypizaci pomocí průtokové cytometrie. Ke standardním cytogenetickým metodám využívaných při diagnostice MDS pro detekci chromozomálních abnormalit je využívána metoda G-pruhování a metoda FISH se zaměřením na určité chromozómy (5, 7, 8, 17 a další), která se provádí rutinně u všech vyšetřovaných vzorků či při selhání G-pruhování (absence mitóz nebo jejich špatná kvalita), eventuálně mFISH při komplexních změnách karyotypu a komparativní genomová hybridizace na čipu (aCGH) pro komplexnější screening chromozomálních abnormalit (Malcovati *et al.*, 2013; Killick *et al.*, 2014; Čermák, 2016; Ridgeway *et al.*, 2017; Valent *et al.*, 2017; Čermák *et al.*, 2020). V dnešní době je diagnostika obohacena ještě o molekulárně-genetická vyšetření buněk KD, které je nutno provést např. u pacientů s MDS-RS pro zjištění mutace sestřihového genu *SF3B1*, ve většině případů je však pouze doporučeno (Čermák *et al.*, 2020). Souhrn standardních a doporučených diagnostických postupů myelodysplastického syndromu publikovaný evropskou odbornou skupinou European LeukemiaNet je znázorněn v Tabulce 1 níže (Malcovati *et al.*, 2013; Čermák *et al.*, 2020).

Tabulka 1: Diagnostické přístupy využívané při stanovování diagnózy myelodysplastického syndromu (upraveno dle Malcovati *et al.*, 2013).

Vyšetřovací metoda	Diagnostická kritéria	Preference
Nátěr periferní krve	<ul style="list-style-type: none"> • zhodnocení uni-/multilineární dysplazie¹ • zastoupení blastů² 	povinné
Aspirát kostní dřeně	<ul style="list-style-type: none"> • zhodnocení uni-/multilineární dysplazie¹ • zastoupení blastů² a prstenčitých sideroblastů 	povinné
Trepanobiopsie	<ul style="list-style-type: none"> • posouzení buněčnosti kostní dřeně a stupně fibrózy • zastoupení CD34+ buněk³ 	povinné
Cytogenetické vyšetření (kultivace + G-pruhování)	<ul style="list-style-type: none"> • detekce klonálních chromozomálních abnormalit umožňující průkaznou diagnózu a určení prognózy 	povinné
FISH	<ul style="list-style-type: none"> • detekce cílených chromozomálních abnormalit při opakovaném selhání standardního G-pruhování 	doporučené
Imunofenotypizace	<ul style="list-style-type: none"> • detekce abnormalit exprese povrchových antigenů ve zralých i nezralých buňkách jednotlivých krvetvorných řad a určení typu + zastoupení blastů 	doporučené
SNP array	<ul style="list-style-type: none"> • detekce chromozomálních abnormalit ve vysokém rozlišení při kombinaci s cytogenetickým vyšetřením na metafázích 	navrhované
Analýza mutací kandidátních genů	<ul style="list-style-type: none"> • detekce somatických mutací (průkazná diagnóza a spolehlivá prognostická stratifikace) 	navrhované

¹ doporučeno kvalifikovat nález jako dysplazii od ≥ 10 % dysplastických buněk uvažované myeloidní řady; ² < 20 % blastů; ³ jsou nezralé (kmenové/progenitorové) hematopoetické buňky

Možných vyšetření je však mnohem více (stanovení sérového erythropoetinu – sEPO, hodnoty laktátdehydrogenázy, sérologický průkaz virových onemocnění apod.) a vždy záleží

na individuálním přístupu k pacientovi. Výsledky získané hodnocením periferní krve i kostní dřeně s případnými cytogenetickými nálezy slouží ke klasifikaci subtypu (především dle WHO klasifikace – recentní verze viz Tabulka 4 níže) a určení závažnosti MDS stratifikací pacienta do rizikové skupiny (dle IPSS, který je popsán v revidované podobě v Tabulce 5 a 6 níže), což souvisí i s doporučením následného terapeutického postupu (Kissová, 2011; Killick *et al.*, 2014). Nález specifické cytogenetické abnormality může navíc hrát roli markeru poskytující možnost sledování odpovědi na indikovanou léčbu (Killick *et al.*, 2014). Samotný cytogenetický či molekulárně-genetický nález při absenci morfologických kritérií však nemusí vždy jednoznačně prokazovat diagnózu MDS, jelikož mnoho chromozomálních abnormalit a somatických mutací vyskytujících se u pacientů s MDS se objevuje i v hematopoetických buňkách zjevně zdravých starších jedinců či u jiných diagnóz (např. ztráta chromozómu Y, trizomie chromozómu 8, delece dlouhého raménka chromozómu 20, somatické mutace asociované hlavně s geny *DNMT3A*, *TET2* atd. (Kissová, 2011; Arber *et al.*, 2016; Valent *et al.*, 2017).

U pacientů, kteří nesplňují minimální diagnostická kritéria tohoto onemocnění, je doporučeno opakované vyšetření KD po 6 měsících pro jednoznačné stanovení diagnózy MDS (Vondráková, 2010; Malcovati *et al.*, 2013; Killick *et al.*, 2014).

3.2.4 Klasifikace a prognostické skórovací systémy

Jak již bylo zmíněno v úvodu této podkapitoly, existují 2 typy klasifikace, a to jednodušší FAB klasifikace a z ní vyplývající nynější WHO klasifikace. Jako prognostický skórovací systém se v dnešní době nejvíce využívá Mezinárodní prognostický skórovací systém revidovaný roku 2012 (IPSS-R) stratifikující pacienty s MDS dle vypočteného prognostického skóre do 5 rizikových skupin, které se liší léčebným přístupem, délkou přežití a různým rizikem transformace MDS do AML (Čermák, 2013; Červinek, 2015).

FAB klasifikace

Prvotní zmínky o dysmyelopoetickém syndromu z roku 1976 a jeho zavedené třídění do 2 kategorií bylo následně roku 1982 přetvořeno do systematictější klasifikace, která je ještě doposud mnohými lékaři užívána (převažuje ale snaha jednotné klasifikace). Tato původní klasifikace rozděluje pacienty s MDS do 5 podtypů (viz Tabulka 2 níže) a je založena především na kvalitativních a kvantitativních morfologických nálezech v kostní dřeni a periferní krvi (hlavně na zastoupení blastů v KD/PK a přítomnosti či absenci prstenčitých

sideroblastů) (Bennett *et al.*, 1976; Bennett *et al.*, 1982; Germing *et al.*, 2000; Malcovati *et Nimer*, 2008; Čermák, 2013).

Tabulka 2: FAB (francouzsko-americko-britská) klasifikace myelodysplastického syndromu z roku 1982 (upraveno dle Bennett *et al.*, 1982; Čermák, 2013).

Podtyp MDS	Zastoupení blastů ¹ v PK	Zastoupení blastů ¹ v KD	Zastoupení prstenčitých sideroblastů ² v KD
Refrakterní anémie (RA)	< 1 %	< 5 %	< 15 %
Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)	< 1 %	< 5 %	> 15 %
Refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB)	< 5 %	5–20 %	různé
Refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci (RAEB-t)	> 5 %	21–30 %	různé
Chronická myelomonocytární leukémie (CMML)	< 5 %	≤ 20 %	různé

PK – periferní krev; KD – kostní dřeň; ¹ nezralé formy krevních elementů; ² erytroblast s granuly obsahujícími zásobní železo, které ještě nebylo zabudováno do hemoglobinu (nezralé stádium erytrocytu) (Bourková *et al.*, 2011).

RAEB-t podtyp MDS je také charakteristický přítomností Auerových tyčí (tyčkovité útvary nacházející se v cytoplazmě myeloblastů, které vznikly splynutím azurofilních zrn zachovávajících si svou lytickou funkci) ve vzorku PK či KD, naopak podtyp CMML je mimo jiné charakteristická i přítomností více než $1 \cdot 10^9$ monocytů/l v PK (Bennett *et al.*, 1982; Pecka, 2006a; 2006b). RA a RARS jsou podtypy odrážející časnější formy MDS s lepší prognózou pro pacienta, zatímco podtypy RAEB, RAEB-t a CMML odpovídají spíše pozdním fázím MDS a jsou spojovány s vyšším rizikem leukemizace (Pecka, 2006a; Trněný *et al.*, 2020).

Nevýhodou této klasifikace je, že nebere v úvahu jiné než morfologické aspekty a ani nerozlišuje krvetvorné linie vykazující dysplazii či počet cytopenií v PK (Pecka, 2006a; Malcovati *et Nimer*, 2008). Zároveň má jen minimální prognostickou výpovědní hodnotu a hraniční hodnoty procentuálního zastoupení blastů v KD pro rozlišení MDS od diagnózy AML je minimálně 30 %, zatímco u WHO klasifikace je tato mez snížena na minimálně 20 % blastů v KD pro AML (Bennett *et al.*, 1982; Trněný *et al.*, 2020). Proto bylo nutné nahradit tuto klasifikaci ucelenější, jelikož přesná stratifikace pacientů s MDS je nesmírně důležitý krok nejen pro určení správné diagnózy podtypu MDS a pro prognózu těchto pacientů, ale v první řadě pro volbu adekvátního terapeutického postupu. Heterogenita tohoto onemocnění ale tento krok velmi komplikuje, proto byl velký tlak vytvořit podrobnější klasifikaci založenou i na jiných než morfologických kritériích a zároveň vytvořit systematictější prognostický skórovací systém zahrnující co nejvíce faktorů a zohledňující nejen morfologické změny spojené s MDS (Malcovati *et Nimer*, 2008; Kadlčková *et Rohoň*, 2014).

WHO klasifikace

Recentní klasifikace byla vytvořena pracovníky Světové zdravotnické organizace (WHO) v roce 1999 a zcela přijatá byla roku 2001, kdy nahradila zastaralou FAB klasifikaci z roku 1982, která sloužila jako její předloha. Tato klasifikace rozděluje pacienty s MDS do 8 podtypů. Došlo tedy k vyčlenění dalších podtypů z původních podtypů FAB klasifikace (např. RA byla rozdělena na podtypy s cytopenií v jedné či více řadách; RAEB byl rozčleněn na podtypy RAEB-1 a RAEB-2 dle početního zastoupení blastů v PK a KD; vyčleněn byl i 5q- syndrom, který je spojen s lepší prognózou pro pacienty; RAEB-t byl přemístěn do skupiny AML a CMML do skupiny myelodysplasticko-myeloproliferativních onemocnění). Pro pacienty, kteří nesplňují určitá diagnostická kritéria tak, aby byli zařazeni do konkrétního podtypu WHO klasifikace (např. pacienti s 1 % blastů v PK nebo pacienti s 1 dysplastickou linií a rovněž pancytopení...), byl vytvořen podtyp neklasifikovatelný MDS (MDS-U), kam tito pacienti spadají.

WHO klasifikace z roku 2001 byla následně revidována v roce 2008 a 2016 (srovnání FAB a WHO klasifikací je zobrazeno v Tabulce 3 níže), kdy došlo k dalšímu přesnějšimu rozdělení a doplnění na základě nových poznatků z klinických a vědeckých studií (Germing *et al.*, 2000; Vardiman *et al.*, 2009; Čermák, 2013; Arber *et al.*, 2016; Trněný *et al.*, 2020).

Tabulka 3: Srovnání původně užívaných klasifikací myelodysplastického syndromu – FAB, WHO 2001 a WHO 2008 (upraveno dle Čermák, 2013).

Podtyp FAB	Podtyp WHO 2001	Podtyp WHO 2008
Refrakterní anémie (RA)	RA	RCUD (RA, RN a RT)
	RCMD	RCMD, RCMD-RS
	5q- syndrom	5q- syndrom
	MDS-U	MDS-U
Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)	RARS	RARS
	RCMD-RS	RARS s trombocytózou přesunut do MDS/MPS
Refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB)	RAEB-1	RAEB-1
	RAEB-2	RAEB-2
Refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci (RAEB-t)	AML	AML
Chronická myelomonocytární leukémie (CMML)	MDS/MPS	MDS/MPS

RCUD – refrakterní cytopenie s unilineární dysplazií; RN – refrakterní neutropenie; RT – refrakterní trombocytopenie; RCMD – refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií; RCMD-RS – refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií a prstenčitými sideroblasty; MDS-U – neklasifikovatelný myelodysplastický syndrom; AML – akutní myeloidní leukémie; MDS/MPS – myelodysplasticko-myeloproliferativní onemocnění

Pacienti s MDS jsou tedy klasifikováni pomocí kritérií WHO klasifikace, a to především na základě stupně dysplazie a procentuálního zastoupení blastů v KD a PK, méně

pak na základě počtu cytopenií, cytogenetických nálezů v KD, procentuálního zastoupení prstenčitých sideroblastů (současná podoba viz Tabulka 4 níže). Poslední revize byla provedena v roce 2016, ale nepředstavuje zásadní změny ve WHO klasifikaci 2008. Došlo pouze k nahrazení termínů jako refrakterní anémie a refrakterní cytopenie (u podtypů charakteristických pro dospělé pacienty) termínem myelodysplastický syndrom s odpovídajícím appendixem (v jedné či více řadách, bez/s prstenčitými sideroblasty atd.). Zároveň byly začleněny nové poznatky k již existujícím podtypům (Arber *et al.*, 2016).

Tabulka 4: Recentní revize WHO klasifikace myelodysplastického syndromu z roku 2016 (upraveno dle Arber *et al.*, 2016; Trněný *et al.*, 2020).

Podtyp MDS	Zastoupení blastů v KD	Zastoupení blastů v PK	Počet cytopenií	Počet dysplastických linií	Zastoupení prstenčitých sideroblastů
MDS s dysplazií v jedné řadě (MDS-SLD)	< 5 %	< 1 %	1–2	1	< 15 % < 5 %*
MDS s dysplazií ve více řadách (MDS-MLD)	< 5 %	< 1 %	1–3	2–3	< 15 % < 5 %*
MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS): – MDS-RS-SLD – MDS-RS-MLD	< 5 %	< 1 %	MDS-RS-SLD: 1–2 MDS-RS-MLD: 1–3	MDS-RS-SLD: 1 MDS-RS-MLD: 2–3	≥ 15 % ≥ 5 %*
MDS s izolovanou del(5q) (5q- syndrom)	< 5 %	< 1 %	1–2	1–3	různé
MDS s nadbytkem blastů (MDS-EB): – typ 1 (MDS-EB1) – typ 2 (MDS-EB2)	MDS-EB1: 5–9 % MDS-EB2: 10–19 %	MDS-EB1: 2–4 % MDS-EB2: 5–19 %	1–3	0–3	různé
MDS neklasifikovatelný (MDS-U)	< 5 %	≤ 1 %	1–3	0–3	různé
Dětská refrakterní cytopenie (RCC)	< 5 %	< 2 %	1–3	1–3	žádné

SLD – unilineární dysplazie; MLD – multilineární dysplazie; * v případě přítomnosti mutace *SF3B1* u pacienta

Jedním z kritéria WHO klasifikace jsou také změny v karyotypu, ty mohou být jakékoliv u jednotlivých podtypů, ale u podtypů MDS-SLD, MDS-MLD a MDS-RS kromě nálezu izolované del(5q). Tento nález je v těchto případech charakteristický pro podtyp MDS s izolovanou del(5q), a to i s jednou přídatnou abnormalitou s výjimkou del(7q) či monozomie chromozómu 7 (Arber *et al.*, 2016).

WHO klasifikace má i určitý prognostický význam (např. pacienti s 5q- syndromem mají velmi dobrou prognózu). Proto byla snaha vytvořit ucelenější prognostický systém přímo

na podkladě WHO klasifikace, což se stalo roku 2007, kdy byl vytvořen tzv. WPSS (WHO classification-based Prognostic Scoring System) viz níže (Čermák, 2013).

Mezinárodní prognostický skórovací systém (IPSS)

I když FAB a WHO klasifikace mají určitý prognostický význam, nezahrnují veškeré faktory ovlivňující prognózu tohoto onemocnění, a navíc široká heterogenita tohoto onemocnění (nejen co se klinického průběhu týče, ale i cytogenetických nálezů a prognózy) tak donutila vytvořit specifitější stratifikační rizikový systém založený na více hlediscích, která by jasně determinovala u jednotlivých pacientů s MDS prognózu, riziko transformace do AML a umožnila by tedy i včasnou optimální léčbu. Takový prvotní prognostický systém byl vytvořen v roce 1997, tzv. IPSS (Mezinárodní prognostický skórovací systém), který pacienty s MDS původně dělí do 4 rizikových skupin (nízké, střední I, střední II a vysoké) s odlišným celkovým přežitím a s odlišnou pravděpodobností transformace do AML, a to na základě procentuálního zastoupení blastů v KD, počtu cytopenií v PK a také počtu a charakteru abnormalit nalezených v karyotypu. Dle zařazení pacientů do jednotlivých rizikových skupin se odvíjí i následný terapeutický postup. Celkové přežití však jasně nedeterminuje dobu přežití jednotlivců, jedná se pouze o průměrné hodnoty stanovené statisticky z analýzy velké skupiny pacientů s MDS, na což je potřeba myslet (Greenberg *et al.*, 1997; Malcovati *et Nimer*, 2008; Vondráková, 2010; Čermák, 2013; Čermák, 2016).

Tento mezinárodní prognostický systém byl revidován (IPSS-R) v roce 2012, kdy došlo k zahrnutí nových poznatků a také k rozdělení pacientů s MDS nově do 5 rizikových skupin na základě stejných prognostických kritérií, ale s rozsáhlejší variabilitou cytogenetických změn a závažností cytopenie (zahrnuje např. hladiny hemoglobinu, počet neutrofilů a trombocytů) (Greenberg *et al.*, 2012). Pro hodnocení cytogenetických nálezů u pacientů s MDS byl zvolen pěti stupňový cytogenetický skórovací systém publikovaný na začátku téhož roku (viz Tabulka 5 níže) (Schanz *et al.*, 2012). Tento obecně přijímaný prognostický skórovací systém je uveden v jeho recentní přesnější podobě v Tabulce 5 a 6 níže.

Výsledné prognostické skóre pacienta je určeno celkovým součtem bodů z 5 výše zmíněných prognostických kritérií a determinuje jednu z 5 rizikových skupin (IPSS-R), která současně predikuje medián celkového přežití a riziko zvratu MDS do AML – viz Tabulka 6 níže (Málek, 2005; Greenberg *et al.*, 2012).

Tabulka 5: Bodové hodnocení jednotlivých kritérií IPSS-R (Mezinárodní prognostický skórovací systém – revidovaný) pro MDS se znázorněným cytogenetickým skórovacím systémem ve spodní části tabulky (upraveno dle Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012).

Prognostické kritérium	Body						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Zastoupení blastů v kostní dřeni [%]	≤ 2	–	> 2– < 5	–	5–10	> 10	–
Hemoglobin [g/dl]	≥ 10	–	8– < 10	< 8	–	–	–
Počet trombocytů [$\cdot 10^9/l$]	≥ 100	50– < 100	< 50	–	–	–	–
Počet neutrofilů [$\cdot 10^9/l$]	≥ 0,8	< 0,8	–	–	–	–	–
Karyotyp*	velmi příznivý	–	příznivý	–	střední	nepříznivý	velmi nepříznivý
* Karyotyp	Cytogenetické abnormality					Medián celkového přežití [měsíce]	
Velmi příznivý	-Y, del(11q)					60,8	
Příznivý	normální nález, del(5q), del(12p), del(20q) nebo del(5q) + další abnormalita					48,6	
Střední	del(7q), +8, +19, i(17q), další 1–2 jakékoliv nezávislé klony					26,0	
Nepříznivý	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), 2 abnormality zahrnující -7 nebo del(7q), komplexní karyotyp se 3 abnormalitami					15,8	
Velmi nepříznivý	komplexní karyotyp s více než 3 abnormalitami					5,9	

* Cytogenetický skórovací systém MDS dle Schanz *et al.*, 2012

Tabulka 6: Jednotlivé rizikové kategorie IPSS-R (Mezinárodní prognostický skórovací systém – revidovaný) pro MDS predikující zároveň celkové přežití a dobu do progresu AML u pacientů s MDS (upraveno dle Greenberg *et al.*, 2012).

Riziková kategorie	Skóre	Medián celkového přežití [roky]	Medián doby do progresu AML u ¼ pacientů [roky]
Velmi nízká	≤ 1,5	8,8	> 14,5
Nízká	> 1,5–3,0	5,3	10,8
Intermediární	> 3,0–4,5	3,0	3,2
Vysoká	> 4,5–6,0	1,6	1,4
Velmi vysoká	> 6,0	0,8	0,7

Celkové přežití je také negativně ovlivněno vyšším věkem pacienta – čím starší je pacient, tím je doba celkového přežití kratší. Věk pacienta však nemá vliv na progresi tohoto onemocnění do AML (Greenberg *et al.*, 2012).

Mezinárodní prognostický systém je vhodnější použít při stanovování diagnózy než pro sledování průběhu onemocnění, pro toto užití byl vytvořen prognostický systém zohledňující další faktory – WPSS (Vondráková, 2010). Důležitý význam (podobně jako ostatní prognostické a klasifikační systémy) má však při doporučení terapeutického přístupu. U pacientů s nízkým a u některých pacientů se středním rizikem se volí spíše konzervativní léčba, zatímco u ostatních pacientů se středním a vysokým rizikem se indikuje především intenzivní terapie včetně HSCT (Čermák, 2013).

Prognostický skórovací systém založený na WHO klasifikaci (WPSS)

Tento prognostický systém zohledňuje zařazení pacienta do rizikových skupin na základě MDS podtypů dle WHO klasifikace (původně WHO klasifikace z roku 2001), změny karyotypu (podle IPSS) a pacientovu závislost na substitucích erytrocytů, což je hodnoceno jako nepříznivý prognostický faktor (viz Tabulka 7 níže). Tento dynamický prognostický skórovací systém je vhodné využít pro sledování průběhu a vývoje onemocnění (Malcovati *et al.*, 2007; Vondráková, 2010; Čermák, 2013). WPSS byl již také validován pro WHO klasifikaci 2008 (Della Porta *et al.*, 2015). Stejně jako IPSS, tak i WPSS nezohledňuje, zdali pacient trpí sekundární MDS (t-MDS), u kterého bylo prokázáno, že má horší prognostický dopad na pacienta než primární MDS, což může odrážet asociaci t-MDS s velmi častým nepříznivým cytogenetickým nálezem u těchto pacientů (Málek, 2005; Barzi *et al.*, 2010; Della Porta *et al.*, 2015). Průměrná doba celkového přežití pacientů s t-MDS se pohybuje v rozmezí 3–8 měsíců (Málek, 2005).

Tabulka 7: Bodové hodnocení jednotlivých kritérií WPSS (WHO classification-based Prognostic Scoring System) pro MDS (upraveno dle Malcovati *et al.*, 2007).

Body	0	1	2	3
Podtyp MDS dle WHO klasifikace 2001	RA, RARS, 5q- syndrom	RCMD, RCMD-RS	RAEB-1	RAEB-2
Karyotyp (dle IPSS)	příznivý	intermediární	nepříznivý	–
Transfúzní závislost*	ne	ano	–	–

* definováno jako minimálně 1 transfúze každých 8 týdnů po dobu nejméně 4 měsíců; RA – refrakterní anémie; RARS – refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty; RCMD – refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií; RCMD-RS – refrakterní cytopenie s prstenčitými sideroblasty a s multilineární dysplazií; RAEB 1/2 – refrakterní anémie s excesem blastů 1/2

Definitivní WPSS skóre je tedy determinováno celkovým součtem bodů jednotlivých kritérií a definuje 5 rizikových skupin predikujících současně medián celkového přežití a riziko progresu do AML – viz Tabulka 8 (Malcovati *et al.*, 2007; Della Porta *et al.*, 2015).

Tabulka 8: Rizikové kategorie prognostického skórovacího systému založeném na WHO klasifikaci (WPSS) s prediktivními charakteristikami (upraveno dle Malcovati *et al.*, 2007).

Riziková kategorie	Skóre	Medián celkového přežití v měsících	Progrese do AML během 2 let	Progrese do AML během 5 let
Velmi nízká	0	141	3 %	3 %
Nízká	1	66	6 %	14 %
Střední	2	48	21 %	33 %
Vysoká	3–4	26	38 %	54 %
Velmi vysoká	5–6	9	80 %	84 %

Současným hlavním cílem je najít takové prognostické aspekty, které by jednoznačně upřesnily indikaci potenciálně vysoce rizikových pacientů v časných stádiích MDS pro HSCT již v počátcích onemocnění, u nichž by se tak předešlo následným závažným komplikacím či rychlé progresi do AML a nesla by tak s sebou jednoznačný přínos (Čermák, 2016).

3.2.5 Léčba

Současné léčebné možnosti pacientů s MDS jsou nadále velmi omezené, navíc vývoj nových terapeutik je bržděn stále neúplným pochopením etiopatogeneze tohoto onemocnění a ohromnou heterogenitou potenciálních terapeutických cílů, protože pacienti s MDS nedisponují žádnou jednotnou molekulární charakteristikou, která by mohla sloužit jako společný cíl pro léčbu všech pacientů s MDS. Oproti tomu se vyvíjí terapeutika pro jednotlivé podtypy MDS, např. lenalidomid pro pacienty s izolovanou delecí 5q (Germing *et al.*, 2019).

Léčba pacientů s MDS je nicméně v mnoha případech pouze symptomatická. Při volbě optimálního léčebného postupu se přihlíží nejen k podtypu MDS, ale jak již bylo v předešlé podkapitole zmíněno, hraje významnou roli také prognostická stratifikace onemocnění (obvykle dle IPSS-R), kdy jsou pacienti na základě stanovené rizikové kategorie a s přihlédnutím ke komorbiditám a věku indikováni buď ke konzervativní nebo intenzivní terapii, případně i k HSCT (Kissová, 2011; Malcovati *et al.*, 2013; Bělohávková *et al.*, 2016; Trněný *et al.*, 2020).

Cílem léčby u vysoce rizikových pacientů je především ovlivnit přirozený průběh choroby (předejít smrtelným komplikacím) a zlepšit tak prognózu pacienta. U nízké rizikových pacientů je léčba především symptomatická a podpůrná s cílem zlepšit kvalitu života (např. snížit či úplně odstranit transfúzní dependenci) (Krejčí *et al.*, 2008; Germing *et al.*, 2019).

Léčba nízké rizikového MDS (pacienti s velmi nízkým a nízkým rizikem dle IPSS-R)

U asymptomatických pacientů s nízké rizikovou MDS bez závislosti na transfúzích a bez nepříznivého cytogenetického nálezu se doporučuje pouze pečlivá observace.

U symptomatických pacientů s nízké rizikovým MDS je doporučováno 5 základních terapeutických přístupů, a to podpůrný, stimulační, imunosupresivní, imunomodulační, případně i transplantace hematopoetických kmenových buněk (viz Obrázek 2 níže). Mezi podpůrné léčebné strategie se řadí substituce erytrocytů u anemických pacientů (u pacientů s potenciálně delším přežitím i s případnou chelatační léčbou při přetížení organismu železem) a u pacientů s trombocytopenií pak transfúze trombocytů. Nejen u pacientů s dlouhodobou granulocytopenií je podpůrnou léčbou podávání širokospektrých antibiotik a antimykotik. Podpůrná péče je však indikována dle potřeby ve všech rizikových skupinách. Do stimulačního léčebného postupu řadíme u anemických pacientů s nízkou endogenní hladinou erytropoetinu jako první volbu suplementaci erytropoézu stimulačními proteiny (analoga erytropoetinu – rekombinantní lidský erytropoetin, darbopoetin...). Při nedostatečné odpovědi organismu na tuto stimulační léčbu je možno podání analoga erytropoetinu zkombinovat s G-CSF, který se také využívá pro léčbu pacientů s těžkou granulocytopenií. K imunosupresivní léčbě se přistupuje u pacientů, kteří nemohou být indikováni k HSCT nebo stimulační léčbě růstovými faktory. Zároveň jsou tímto přístupem léčeni i pacienti s hypoplastickou formou MDS. Pozitivní účinek této léčby se většinou objeví u pacientů mladších 65 let bez abnormálního karyotypu, s nízkým zastoupením blastů a krátkodobou transfúzní závislostí. Využívá se antitymocytární globulin kombinovaný s prednisonem a s navazující léčbou cyklosporinem A (Krejčí *et al.*, 2008; Vondráková, 2010; Malcovati *et al.*, 2013; Bělohávková *et al.*, 2016; Čermák, 2016; Steensma, 2018; Čermák *et al.*, 2020). U anemických pacientů s izolovanou delecí 5q je indikována imunomodulační léčba lenalidomidem (analog thalidomidu), která významně snižuje dependenci na transfúzích a zastoupení patologického klonu (List *et al.*, 2005; Čermák, 2016; Germing *et al.*, 2019).

U pacientů mladších 65 let s těžkým stupněm cytopenie anebo nepříznivým cytogenetickým nálezem je doporučena HSCT, která je ovšem vždy závislá i na pacientových komorbiditách a dostupnosti dárce (Malcovati *et al.*, 2013; Bělohávková *et al.*, 2016; Čermák *et al.*, 2020).

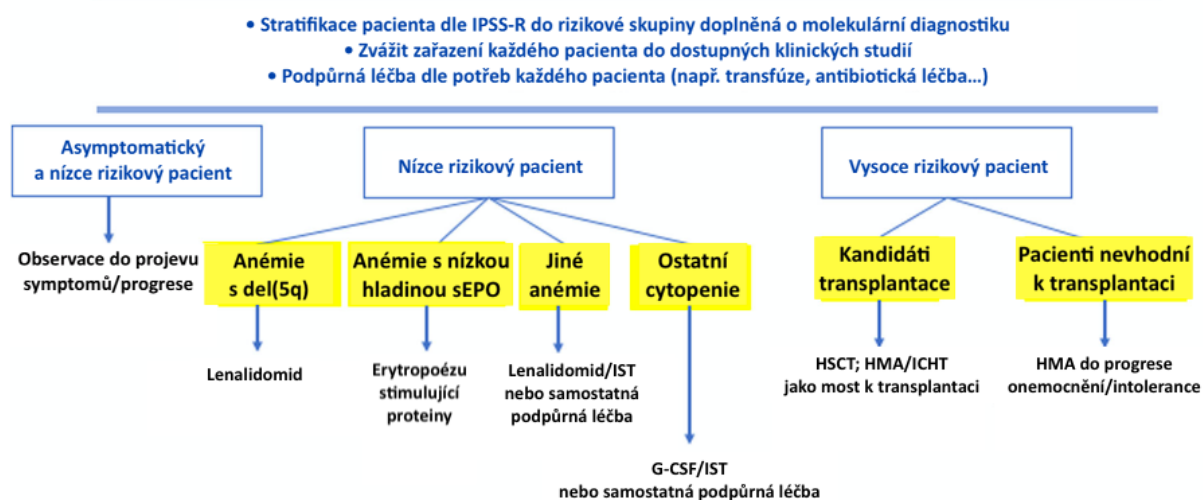
Léčba vysoce rizikového MDS (pacienti s vysokým a velmi vysokým rizikem dle IPSS-R)

Mezi intenzivní terapeutické přístupy řadíme shodné přístupy jako pro léčbu AML, tedy kombinovanou chemoterapii obsahující antracykliny a cytosin arabinosid (u pacientů mladších

65–70 let s více než 10 % blastů a uspokojivým celkovým klinickým stavem). U těchto mladších pacientů je po chemoterapeutickém předlčení následně doporučena alogenní HSCT, což je nadále jediná možná kurativní léčba (Kissová, 2011; Malcovati *et al.*, 2013; Červinek, 2015; Bělohávková *et Rohoň*, 2016; Čermák *et al.*, 2020; Kunacheewa *et al.*, 2020; Trněný *et al.*, 2020). U pacientů, kteří nejsou kandidáti pro HSCT (vysoký věk, komorbidity, nevyhovující celkový stav pacienta...), je indikována hypometylační léčba pomocí 5-azacytidinu nebo decitabinu, což jsou inhibitory DNA metyltransferáz a jedním z jejich mechanismů účinku je ovlivnění metylací v oblastech důležitých genů pro diferenciaci časných stádií krvetvorných buněk. Tyto hypometylační látky (HMA) výrazně zlepšují krátkodobou prognózu nemocných s vysoce rizikovou MDS, ale na dlouhodobé přežívání těchto pacientů nemají zásadní vliv (Fenaux *et al.*, 2009; Malcovati *et al.*, 2013; Kadlčková *et Rohoň*, 2014; Čermák *et al.*, 2018). HMA se také užívají u kandidátů HSCT k přemostění doby do provedení transplantace jako látky redukující zastoupení blastů a snižující incidenci relapsů po transplantaci. Tato méně toxická pretransplantační léčba (tzv. předlčení) je srovnatelná (vyjma toxicity) s intenzivní kombinovanou chemoterapií a je také dále vhodná i pro léčbu pacientů s relapsem po transplantaci. Obě tato užití jsou však „off-label“ indikací (Gerds *et al.*, 2012; Kadlčková *et Rohoň*, 2014; Schroeder *et al.*, 2015; Germing *et al.*, 2019; Čermák *et al.*, 2020). U starších pacientů s nevyhovujícím celkovým klinickým stavem pro HSCT, kombinovanou chemoterapii či při špatné odpovědi pacienta na HMA a nemožnosti účasti pacienta na klinických studiích, se podává pouze symptomatická podpůrná léčba (Málek, 2005; Krejčí *et al.*, 2008). Zjednodušený léčebný algoritmus myelodysplastického syndromu je znázorněn na Obrázku 2 (viz níže).

Na pacienty se středním rizikem dle IPSS-R se pohlíží nejednotně a nepřevládá u nich jednoznačný názor na postup léčby. Jejich léčba je určena mnoha dalšími aspekty (např. molekulárně-genetickými či mírou cytopenie). U mladších pacientů se středně rizikovým MDS je většinou indikována HSCT (Čermák, 2019; Čermák *et al.*, 2020).

Současný léčebný algoritmus myelodysplastického syndromu



Obrázek 2: Zjednodušený léčebný algoritmus pacientů s myelodysplastickým syndromem (upraveno dle Malcovati *et al.*, 2013; Steensma, 2018).

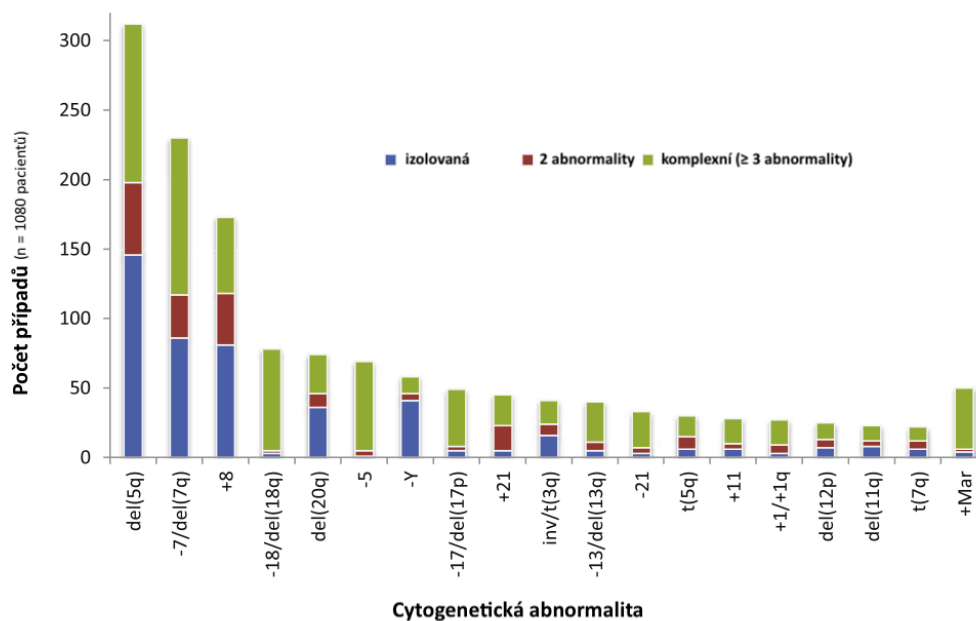
sEPO – sérový erythropoetin; IST – imunosupresivní terapie; G-CSF – granulocyte colony stimulating factor; HMA – hypometylační agens; ICHT – intenzivní chemoterapie; HSCT – transplantace krvetvorných kmenových buněk

Některé léčivé přípravky jsou limitovány pouze na užití v klinických studiích, kdy pro vysoce rizikové pacienty se výzkumy soustředí hlavně na látky vhodné ke kombinaci s HMA, které by zvýšily samotnou účinnost HMA, nebo na látky efektivní při selhání léčby HMA. Jedná se např. o guadecitabin, rigosertib či velmi nadějně vyhlížející venetoclax (inhibitor produktu *BCL2*). Výzkumy nových léčiv pro níže rizikové pacienty se pak soustředí především na hledání takových přípravků, které by snižovaly transfúzní dependenci. Jedním z nich je i lék luspatercept (fúzní protein inhibující jeden z růstových diferenačních faktorů erytroidní řady) indikovaný u pacientů s MDS, u kterých snižuje závislost na transfúzích. Tento léčivý přípravek byl v loňském roce schválen Evropskou lékovou agenturou pro terapeutické účely s registrovaným názvem Reblozyl (Bělohávková *et Rohoň*, 2016; Čermák, 2019; Germing *et al.*, 2019; Čermák *et al.*, 2020; European Medicines Agency, 2020).

3.2.6 Cytogenetické nálezy u pacientů s MDS

Opakující se nálezy určitých cytogenetických abnormalit v buňkách kostní dřeně pacientů s MDS, které jsou stanovené pomocí konvenční cytogenetické analýzy (G-pruhování) či molekulárně-cytogenetickou metodou FISH, nejsou nic výjimečného. Chromozómové aberace se vyskytují přibližně u 50 % pacientů s *de novo* MDS a u zhruba 80 % pacientů s t-MDS. Neexistuje však specifická aberace, která by byla přítomna u každého pacienta s MDS a nejsou ani známy specifické aberace pro každý jednotlivý subtyp MDS (Michalová, 1999;

Haase *et al.*, 2007; Pellagatti *et Boultwood*, 2015). Nejčastěji se v karyotypu nacházejí nebalancované přestavby chromozómů spojené se ztrátou genetické informace, z nichž je nejvíce u izolovaných přestaveb zastoupena delece dlouhého ramene chromozómu 5, 7, 20 nebo ztráta 7. chromozómu. K nejčastějším izolovaným nebalancovaným změnám spojených se získáním genetické informace patří trizomie 8. chromozómu (viz Obrázek 3 níže). Balancované aberace se vyskytují přibližně u 1 % pacientů s MDS, jsou tedy vzácné a k nejčastějším se řadí reciproká translokace mezi 6. a 9. chromozómem nebo translokace/paracentrická inverze dlouhého ramene 3. chromozómu ovlivňující onkogen *EVII* (Haase *et al.*, 2007; Giagounidis *et Haase*, 2013; Malcovati *et al.*, 2013; Pellagatti *et Boultwood*, 2015; Shallis *et al.*, 2018). Pouhý cytogenetický nálezn izolované del(20q), trizomie 8 nebo ztráty chromozómu Y není patognomický a nepoukazuje jednoznačně na diagnózu MDS, ovšem ostatní chromozomální přestavby znázorněné na Obrázku 3 tuto diagnózu podporují (Kissová, 2011; Malcovati *et al.*, 2013). Prediktivní hodnoty jednotlivých chromozómových aberací ovlivňující zařazení pacienta do konkrétní rizikové skupiny jsou znázorněny v Tabulce 5 výše.



Obrázek 3: Zastoupení nejčastějších cytogenetických abnormalit nalezených v kohortě 1080 pacientů s myelodysplastickým syndromem a prokázanými klonálními abnormalitami (upraveno dle Haase *et al.*, 2007; Giagounidis *et Haase*, 2013).

Nejčastějším cytogenetickým nálezem u pacientů s t-MDS je komplexní karyotyp (výskyt ≥ 3 abnormalit v jednom buněčném klonu), který je spojován s velmi nepříznivou prognózou. Prognóza pacientů se neustále zhoršuje v případech zvyšujícího se počtu přítomných abnormalit. Mezi další velmi časté abnormality u pacientů s t-MDS se řadí především ztráta chromozómu 7 či delece jeho dlouhého ramene (v menším procentu i delece dlouhého ramene

5. chromozómu) (Haase *et al.*, 2007; Krejčí *et al.*, 2008; Malcovati *et Nimer*, 2008; Čermák, 2013; Giagounidis *et Haase*, 2013). Komplexní karyotyp se také nachází u 10–20 % pacientů s *de novo* MDS (Malcovati *et Nimer*, 2008).

Identifikovat specifické geny, které s sebou nese každá chromozomální abnormalita, je velmi náročný proces zejména kvůli rozsáhlým ztrátám či získům genetické informace a dodnes nejsou objasněny veškeré důsledky těchto abnormalit v patogenezi tohoto onemocnění (Giagounidis *et Haase*, 2013; Pellagatti *et Boulwood*, 2015; Shallis *et al.*, 2018). Souhrn identifikovaných genů, které pravděpodobně zaujímají velkou roli v patogenezi MDS u nejčastějších cytogenetických abnormalit, je znázorněn v Tabulce 9 níže.

Tabulka 9: Nejčastější chromozómové aberace vyskytující se u pacientů s MDS a geny pravděpodobně zapojující se v patogenezi tohoto onemocnění (upraveno dle Vardiman *et al.*, 2009; Čermák, 2013; Malcovati *et al.*, 2013; Shallis *et al.*, 2018).

Aberace	Zastoupení aberace u		Zapojené geny v patogenezi MDS
	<i>de novo</i> MDS [%]	t-MDS [%]	
Nebalancované			
del(5q)	10	40	<i>RPS14, miR145, miR146a, CTNNA1 ...</i>
-7 nebo del(7q)	10	50	<i>CUX1, EZH2</i>
+8	10	–	↑ <i>MYC</i>
del(20q)	5–8	–	<i>L3MBTL1</i>
-Y	5	–	?
i(17q) nebo t(17p)	3–5	–	<i>TP53</i>
-13 nebo del(13q)	3	–	<i>RBI</i>
del(11q)	3	–	<i>CBL</i>
del(12p) nebo t(12p)	3	–	<i>ETV6</i>
del(9q)	1–2	–	?
idic(X)(q13)	1–2	–	?
Balancované			
t(11;16)(q23;p13.3)	< 1	3	<i>MLL, CREBBP</i>
t(3;21)(q26.2;q22.1)	< 1	2	<i>RUNX1, MDS1-EVII</i>
t(1;3)(p36.3;q21.2)	< 1	–	<i>PDRM16, MDS1-EVII</i>
t(2;11)(p21;q23)	< 1	–	<i>miR125b</i>
inv(3)(q21;q26.2)	1	–	<i>MDS1-EVII, RPN1, ↑ FLT3</i>
t(6;9)(p23;q34)	1	–	<i>DEK-NUP214</i>

↑ nadměrná exprese

Delece dlouhého ramene 5. chromozómu – del(5q)

Jedná se o nejčastější chromozómovou aberaci přítomnou u pacientů s *de novo* MDS (viz Obrázek 3 výše). Pokud se tato aberace vyskytuje u pacienta izolovaně (5q- syndrom), jedná se o příznivý prognostický znak s dobrou odpovědí pacientů na léčbu lenalidomidem,

naopak pokud je del(5q) součástí rozsáhlejších změn karyotypu, jedná se o znak s nepříznivou prognózou a s horší odpovědí na lenalidomid. Izolované intersticiální delece dlouhého raménka chromozómu zaujímají nejčastěji 2 běžné oblasti (tzv. CDR – commonly deleted region). První z nich je distální oblast identifikovaná jako 5q32-33.1 (typická pro pacienty s 5q- syndromem) a druhou je proximální oblast 5q31.2 (delece této oblasti je spojená s velmi nepříznivou prognózou, vyskytuje se hlavně u pacientů s t-MDS a často je součástí komplexních karyotypů). U většiny pacientů jsou však deletovány obě tyto oblasti. V oblasti 5q31 leží tumor supresorový gen *EGR1* a *CTNNA1* (Haase *et al.*, 2007; Ebert, 2011; Giagounidis *et Haase*, 2013; Pellagatti *et Boultonwood*, 2015; Shallis *et al.*, 2018). V roce 2008 byl prokázán haploinsuficientní efekt ribozomálního genu *RPS14* (jeden ze 40 kandidátních genů), který vede k aktivaci *TP53* a následné apoptóze, což vyúsťuje v dyserythropoézu projevující se anémií u pacientů s delecí v oblasti 5q32-33.1. Dysplastické změny megakaryocytární řady jsou pak důsledkem haploinsuficience genů pro miRNA – *miR145* a *miR146a* u těchto pacientů (Ebert *et al.*, 2008; Ebert, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Giagounidis *et Haase*, 2013; Pellagatti *et Boultonwood*, 2015). Tyto objevy podporují zásadní roli haploinsuficience (efekt dávky genu) v patogenezi myelodysplastického syndromu. Je však třeba podotknout, že na klinickém fenotypu se pravděpodobně podílejí i další geny, které se nacházejí mimo CDR (např. *NPM1* a *APC*) (Pellagatti *et Boultonwood*, 2015).

Delece dlouhého ramene/monozomie 7. chromozómu – del(7q) nebo -7

Jedná se o druhou nejčastější chromozómovou aberaci přítomnou u pacientů s MDS. Vyskytuje se až u poloviny pacientů s t-MDS a velmi často je tato aberace přítomna v komplexních karyotypech (viz Obrázek 3 výše). Dle IPSS jsou tyto aberace charakterizovány nepříznivou prognózou, ale pacienti s del(7q) mají o něco příznivější prognózu oproti pacientům s monozomií chromozómu 7 (Haase *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2012; Pellagatti *et Boultonwood*, 2015). Stejně jako u pacientů s del(5q) byla i u pacientů s aberacemi 7. chromozómu snaha identifikovat tzv. CDR. U pacientů s del(7q) se za tyto oblasti považují oblasti 7q22, 7q32-33 a 7q35-36. Doposud však nebyly nalezeny relevantní geny podílející se na patogenezi MDS. Jedním z kandidátních genů, který by se mohl podílet na fenotypovém projevu MDS, je tumor supresorový gen *CUX1* ležící v oblasti 7q22 a jeho haploinsuficience je prokázána u mnoha myeloidních malignit. Na patogenezi se však nejspíše podílí větší množství genů z tohoto CDR, např. *MLL5 (KMT2E)* (McNerney *et al.*, 2013; Pellagatti *et Boultonwood*, 2015; Shallis *et al.*, 2018). V oblasti 7q36 se nachází gen *EZH2* kódující metyltransferázu, který je kandidátním tumor supresorovým genem podílejícím

se na patogenezi myeloidních malignit, u kterých je často mutovaný (Nikoloski *et al.*, 2010; Shallis *et al.*, 2018).

Trizomie 8. chromozómu (+8)

Jedná se o nejčastější chromozomovou aberaci se získáním genetické informace u MDS. Nachází se přibližně u 10 % pacientů s MDS a dle IPSS je izolovaná trizomie 8. chromozómu spojována se středním rizikem (Haase *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2012; Čermák, 2013). Tato aberace je charakterizována zvýšenou expresí anti-apoptických genů (např. kódující protein survivin) a onkogenu *MYC*. Významnou roli v patogenezi ale u pacientů s touto aberací hraje expanze autoimunitních CD8⁺ T-lymfocytů (Sloand *et al.*, 2005; Sloand *et al.*, 2007; Shallis *et al.*, 2018).

Aberace dlouhého ramene 3. chromozómu – inv(3)(q21q26.2), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.2)

Jedná se o nejčastěji zasažený chromozóm balancovanými aberacemi. Tyto aberace jsou spojené s nepříznivou prognózou a mediánem celkového přežití přibližně 16 měsíců (Schanz *et al.*, 2012; Malcovati *et al.*, 2013). Jedná se však o vzácně se vyskytující aberace. V mnoha případech jsou zasaženy oblasti 3q21 a 3q26. Ve zlomové oblasti 3q26 leží komplexní lokus genu *MECOM* (*MDS1-EVII*). Na fenotypu MDS při těchto aberacích se podílí právě onkogen *EVII* (transkripční regulátor buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy), který je aberací ovlivněn a nadměrně exprimován (Bejar *et al.*, 2011a; Giagounidis *et Haase*, 2013; Pellagatti *et Boulton*, 2015; Shallis *et al.*, 2018). Podrobněji v podkapitole 3.3 Gen *MECOM*.

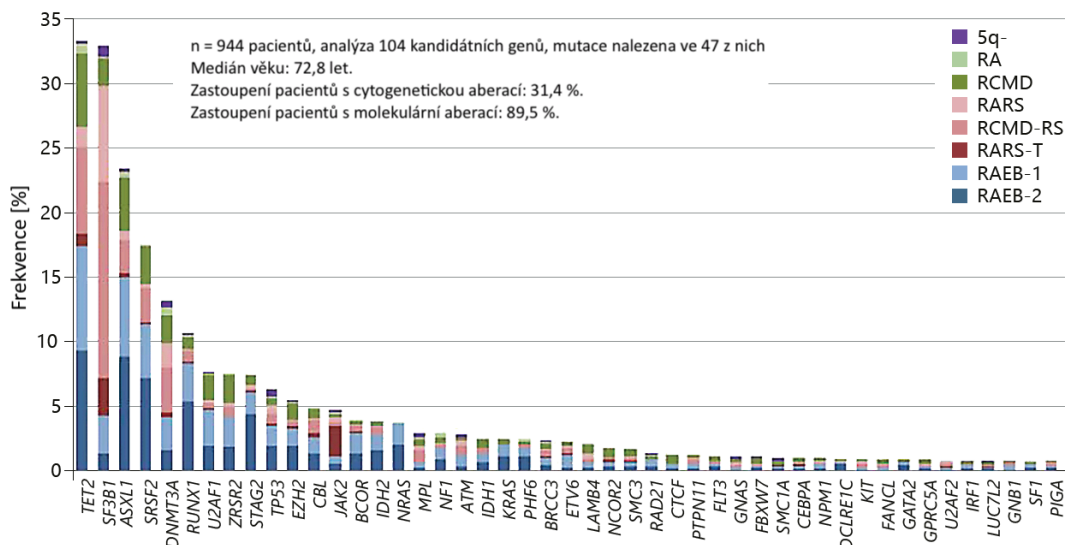
Při kombinaci konvenční cytogenetické metody současně s citlivějšími molekulárními cytogenetickými metodami (FISH, aCGH, SNP array...) lze zachytit až 80 % chromozómových abnormalit na rozdíl od 50% záchyty při využití pouze konvenční cytogenetické metody. Dochází tedy ke zvýšení diagnostického výtěžku chromozomálních abnormalit, což může pacientům poskytnout přesnější stanovení prognózy a výběr optimální léčebné strategie (Malcovati *et al.*, 2013; Zahid *et al.*, 2017; Shallis *et al.*, 2018).

3.2.7 Molekulárně-genetické nálezy u pacientů s MDS

Již z předešlých kapitol vyplývá, že na patogenezi MDS se podílí mnoho faktorů. Díky rozvoji molekulárně-genetických metod mohlo dojít k identifikaci genů, které by se mohly podílet na fenotypu MDS. Mutačními analýzami bylo potvrzeno, že alespoň 1 získaná somatická mutace je přítomna u 80–90 % všech pacientů s MDS (medián pak činí 3 somatické mutace na pacienta) (Haferlach *et al.*, 2014; Arber *et al.*, 2016; Kennedy *et Ebert*, 2017; Shallis

et al., 2018; Haferlach, 2019). Přes 40 genů opakovaně podléhá somatickým mutacím u pacientů s MDS a některé z nich se již také staly významnými kritérii pro stanovení určitých subtypů MDS. Zároveň se také zjistil dopad některých těchto mutací na prognózu a odpověď pacientů na určitou léčbu. Díky důležitosti těchto poznatků jsou již kromě cytomorfoloických a cytogenetických nálezů některé z molekulárních aberací zahrnuty do klasifikačních systémů (revidovaná WHO klasifikace z roku 2016 např. zahrnuje příznivý nález mutace v *SF3B1*, která ovlivňuje diagnostická kritéria – viz Tabulka 4 výše). Prognostický skórovací systém zohledňující nejčastěji opakující se molekulární markery je teprve ve vývoji (IPSS-R molecular) díky ne zcela objasněné roli jednotlivých molekulárních aberací v patogenezi MDS (Arber *et al.*, 2016; Nazha *et al.*, 2016; Kennedy *et al.*, 2017; Haferlach, 2019). Například u mutací *ASXL1*, *RUNX1* a *EZH2* byla prokázána korelace se sníženou hladinou hemoglobinu, mutace *RUNX1*, *TP53*, *NRAS*, *ASXL1* a *U2AF1* pak s trombocytopenií. Také se ukázalo, že mutace v *ASXL1*, *SRSF2*, *RUNX1*, *STAG2* jsou asociovány s větším zastoupením blastů v kostní dřeni (Bejar *et al.*, 2012; Pellagatti *et al.*, 2015). Uvažuje se však, že zahrnutí molekulárních aberací do prognostických systémů bude mít prognostickou hodnotu spíše jen mezi konkrétními podskupinami pacientů (Kennedy *et al.*, 2017).

Mezi nejčastější geny podléhající somatickým mutacím u pacientů s MDS patří *TET2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *STAG2*, *TP53* a *EZH2* (viz Obrázek 4 níže) (Haferlach *et al.*, 2014; Arber *et al.*, 2016).



Obrázek 4: Zastoupení jednotlivých genových mutací v kohortě 944 pacientů s cytomorfoloickým průkazem MDS pomocí sekvenování (NGS) 104 kandidátních genů (upraveno dle Haferlach *et al.*, 2014; Haferlach, 2019).

Geny, které jsou doporučeny analyzovat vzhledem k jejich negativnímu prognostickému dopadu, jsou *TP53*, *ASXL1*, *RUNX1*, *ETV6*, *SRSF2* a *EZH2*. Mutace *TP53* se vyskytují

až u 20 % pacientů s 5q- syndromem a jsou spojeny nejen s horší prognózou, ale také s horší odpovědí na léčbu lenalidomidem. Z tohoto důvodu detekce této konkrétní mutace ovlivňuje volbu následného léčebného postupu (Bejar *et al.*, 2011b; Arber *et al.*, 2016; Kennedy *et al.*, 2017; Haferlach, 2019). Naproti tomu subklonální získ somatických mutací v genech *FLT3*, *IDH1/2*, *NPM1*, *NRAS* a dalších jsou u pacientů s MDS spojeny s rizikem transformace do sekundární AML (Kennedy *et al.*, 2017; Makishima *et al.*, 2017). Bylo také zjištěno, že u vysoce rizikových pacientů s MDS se nacházely častěji somatické mutace např. v genech *GATA2*, *NRAS*, *TP53*, *RUNX1*, *STAG2*, *ASXL1*, *TET2* atd. (Makishima *et al.*, 2017).

Geny podléhající mutacím u pacientů s MDS se dají rozdělit dle vykonávaných funkcí jejich produktů do 6 kategorií. Mutace v genech pro RNA sestřihové faktory (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*...) a epigenetické regulátory (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*...) tvoří převážnou část. Opakovaně (ale méně často) jsou pak nalezeny mutace v genech transkripčních faktorů (*RUNX1*, *ETV6*, *TP53*, *GATA2*...), faktorů signální transdukce (*NRAS*...), oprav DNA a v genech pro kohezinové proteiny (*STAG2*...) (Haferlach *et al.*, 2014; Pellagatti *et al.*, 2015; Kennedy *et al.*, 2017; Shallis *et al.*, 2018; Haferlach, 2019). V Tabulce 10 je blíže popsáno 10 nejčastějších genů opakovaně podléhajících somatickým mutacím u pacientů s MDS.

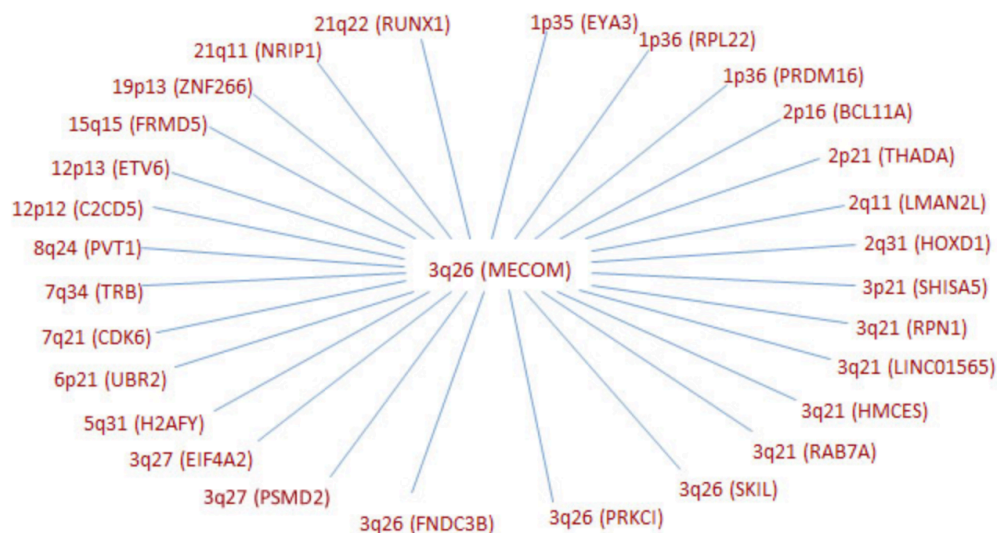
Tabulka 10: Nejběžnější geny zasažené somatickými mutacemi u pacientů s MDS (upraveno dle Pellagatti *et al.*, 2015; Valent *et al.*, 2017; Shallis *et al.*, 2018; Caponetti *et al.*, 2020).

Cílový gen	Umístění genu	Zastoupení mutace u pacientů s MDS [%]	Fyziologická funkce	Prognostický dopad
RNA sestřih				
<i>SF3B1</i>	2q33.1	20–28 (u pacientů s MDS-RS* > 70)	základní součást U2 podjednotky spliceozomu	příznivý
<i>SRSF2</i>	17q25.1	12–15	součást spliceozomu (podílí se na rozeznání exonů během sestřihu)	nepříznivý
<i>U2AF1</i>	21q22.3	7–9	součást U2 podjednotky spliceozomu	nepříznivý
Epigenetické modulátory				
<i>TET2</i>	4q24	20	metylcytosin dioxygenáza (demetylační enzym)	neutrální
<i>ASXL1</i>	20q11.2	11–15	chromatin-vazebný protein podílející se na epigenetické regulaci transkripce	nepříznivý
<i>DNMT3A</i>	2p23.3	10	DNA metyltransferáza	nepříznivý
<i>EZH2</i>	7q36.1	5	histon metyltransferáza	nepříznivý
Transkripční faktory				
<i>RUNX1</i>	21q22.12	10	důležitý ve vývoji hematopoetických buněk (sebeobnova, diferenciace...)	nepříznivý
<i>TP53</i>	17p13.1	5–10	kóduje tumor supresorový protein p53	nepříznivý
Kohezinový komplex				
<i>STAG2</i>	Xq25	7	podjednotka kohezinového komplexu	nepříznivý

*myelodysplastický syndrom s prstenčitými sideroblasty

3.3 Gen *MECOM*

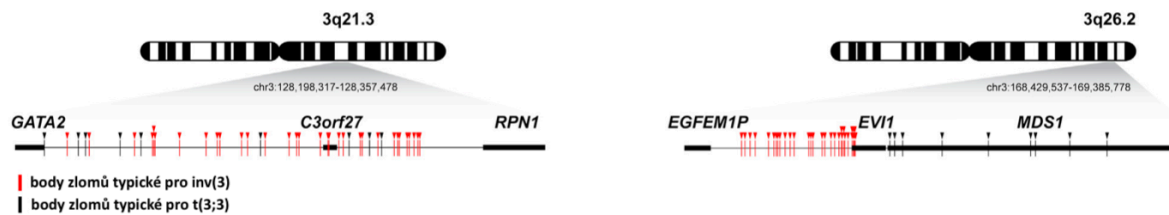
Gen *MECOM* (*PRDM3*, dříve známý jako *EVII*) je komplexní lokus ležící v oblasti 3q26.2 a zahrnuje gen *MDS1* a *EVII* (De Braekeleer *et al.*, 2015; Baldazzi *et al.*, 2016; Wieser, 2016). Tento gen je často alterován v rámci translokací či inverzí dlouhého ramene chromozómu 3 (konkrétně oblasti 3q26.2) u pacientů s AML (< 5 % případů), vzácněji s MDS či u pacientů s blastickou fází CML (chronická myeloidní leukémie) (Soderholm *et al.*, 1997; Lugthart *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2014). Nejčastějšími přestavbami genu *MECOM* jsou $\text{inv}(3)(\text{q}21\text{q}26)$ a $\text{t}(3;3)(\text{q}21;26)$, které se u pacientů s AML objevují v 1–2,5 % (ve WHO klasifikaci pro AML revidované roku 2008 jsou tyto pacienti hodnoceni jako samostatná entita s nepříznivou prognózou), zatímco u pacientů s MDS < 1 % (Vardiman *et al.*, 2009; Lugthart *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2014; Baldazzi *et al.*, 2016). Existuje však celá řada translokačních partnerů, např. při $\text{t}(3;21)(\text{q}26;\text{q}22)$ nebo $\text{t}(3;12)(\text{q}26;\text{p}13)$ dokonce dochází k expresi fúzních proteinů, kdy je *MDS1-EVII* exprimován jako fúzní protein v prvním případě s *RUNX1* (fúzní protein *RUNX1-MDS1-EVII* přítomný převážně u pacientů s t-MDS) a ve druhém s *ETV6* (fúzní protein *ETV6-MDS1-EVII* spojený s progresí MDS do AML). U mnohých translokací však není partnerský gen znám a není tedy objasněna jejich podstata na molekulární úrovni (Peeters *et al.*, 1997; Helbling *et al.*, 2004; Poppe *et al.*, 2006; Glass *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015; Wieser, 2016). Soubor partnerských genů při translokacích genu *MECOM* je zobrazen na Obrázku 5 níže.



Obrázek 5: Souhrn 28 partnerských genů při translokacích genu *MECOM* (upraveno dle Wieser, 2016).

Téměř všechny zlomové části zapojené do $\text{t}(3;3)(\text{q}21; \text{q}26)$ se vyskytují distálně k *EVII*, zatímco k většině zlomům zapojených do $\text{inv}(3)(\text{q}21\text{q}26)$ dochází proximálně vůči *EVII*

(Gröschel *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015). Charakteristické zlomy oblastí 3q21 a 3q26 zapojené jak při t(3;3), tak při inv(3), jsou znázorněny na Obrázku 6 níže.



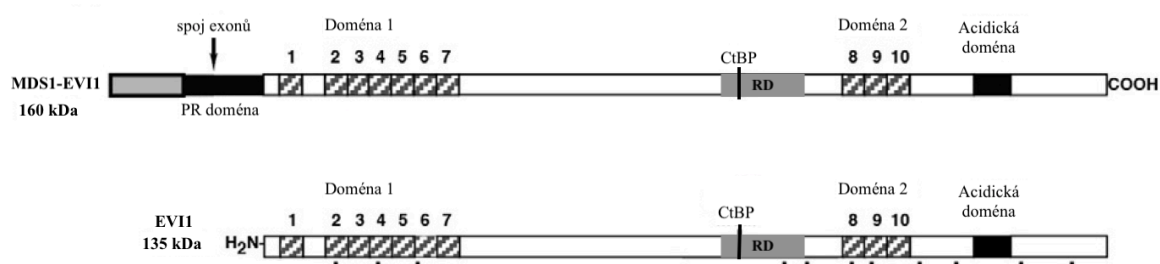
Obrázek 6: Zobrazení typických zlomových bodů u pacientů s t(3;3) nebo inv(3) (upraveno dle Gröschel *et al.*, 2014).

V oblasti 3q26.2 došlo ke zlomům u pacientů s inv(3)(q21q26) výlučně v posledním intronu *EVI1* či proximálně od něj, zatímco zlomové body zapojené do t(3;3)(q21;q26) se vyskytly distálně od genu *EVI1* (v oblasti delší varianty sestříhového transkriptu genu *MDS1-EVI1*). V části 3q21 došlo ke zlomům ve 130kb oblasti mezi geny *GATA2* a *RPN1*. *GATA2* (GATA binding protein 2), *C3orf27* (Long intergenic non-protein coding RNA 1565), *RPN1* (Ribophorin 1), *EGFEM1P* (pseudogen EgF like and EMI domain containing), *EVI1* (Ecotropic Viral Integration Site 1) a *MDS1* (Myelodysplastic Syndrome 1).

Pacienti s abnormalitami 3q26 mají nepříznivou a často až velmi nepříznivou prognózu, jelikož jsou tyto přestavby nejméně u ¼ pacientů součástí komplexně přestavěných karyotypů. Zároveň se ukazuje, že se 3q abnormality diagnostikují častěji u pacientů mladších 60 let. Nejčastější přídatnou aberací u pacientů s inv(3)(q21q26) a t(3;3)(q21;26) je monozomie chromozómu 7 nebo delece 7q (Poppe *et al.*, 2006; Lugthart *et al.*, 2010; Schanz *et al.*, 2012; Rogers *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015; Baldazzi *et al.*, 2016; Sallman *et al.*, 2020). Medián celkového přežití od diagnózy se pohybuje zhruba kolem 16 měsíců (viz Tabulka 5 výše) a medián doby k progresi AML je přibližně 21 měsíců (Schanz *et al.*, 2012).

V rámci alternativního sestřihu může vzniknout z genu *MECOM* více funkčních produktů. Buď celostní transkript lokusu genu *MECOM* (*MDS1-EVI1*) nebo transkript pouze genu *EVI1* (Nucifora, 1997). Oba tyto geny jsou exprimovány ve velmi nízké hladině ve zdravé kostní dřeni, kdy nejvyšší hladiny těchto transkriptů lze nalézt v nejméně zralých formách krevních elementů a v průběhu diferenciaci tyto hladiny klesají (Soderholm *et al.*, 1997; Steinleitner *et al.*, 2012). Transkript genu *MDS1-EVI1* (*MECOM*) je dán sestřihem 2. exonu *MDS1* s 2. exonem *EVI1*, který je translatován za vzniku 160kDa jaderného proteinu MDS1-EVI1 (Glass *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015; Wieser, 2016). Protein MDS1-EVI1 se liší od *EVI1* pouze přítomností rozsáhlejší N' koncové části a uvádí se, že má k proteinu *EVI1* antagonistickou funkci (Soderholm *et al.*, 1997). Protein MDS1-EVI1 obsahuje 2 DNA vazebné domény s motivem zinkových prstů, dále PR doménu (homologní k SET doméně histon metyltransferáz), represorovou doménu bohatou na prolin a kyselé

C' konec – viz Obrázek 7 níže (Nucifora, 1997; Wieser, 2007; Glass *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015). Ukazuje se, že tento protein zastává histon metyltransferázovou aktivitu se schopností epigeneticky modifikovat expresi přidáním 1 metylové skupiny k H3K9 (histon H3 a pozice 9. lysinu), která je nutná pro konečnou trimetylaci H3K9 jiným enzymem (vede k umlčení genové exprese a udržení integrity heterochromatinu). Udržení jak funkce epigenetického modifikátoru, tak i DNA vazebného transkripčního faktoru naznačuje, že MDS1-EVI1 má potenciál nejen rozhodnout, na které oblasti genomu se bude vázat, ale také které oblasti bude epigeneticky ovlivňovat prostřednictvím modifikace histonu H3K9 (Pinheiro *et al.*, 2012; Glass *et al.*, 2014).



Obrázek 7: Architektura proteinu MDS1-EVI1 (160 kDa) a 135 kDa isoformy EVI1 kódované stejným lokusem genu *MECOM* (upraveno dle Wieser, 2007; Glass *et al.*, 2014).

Doména 1/Doména 2 – DNA vazebné motivy zinkových prstů (u domény 1 v zastoupení 7x, u domény 2 jen 3x); spoj exonů – alternativním sestřihem dochází ke spojení 2. exonu genu *MDS1* a 2. exonu genu *EVI1* za vzniku fúzní PR domény, která vykazuje homologii k SET doméně histon metyltransferáz; RD doména – represorová doména bohatá na prolin obsahující vazebné motivy CtBP (C-terminal binding protein).

Chromozomální abnormality zasahující lokus genu *MECOM* obvykle vedou k abnormální expresi pouze distální části tohoto lokusu, tedy genu *EVI1*, u kterého je poznána jeho dominantní onkogenní role u myeloidních (narušení normální hematopoézy) a některých solidních malignit (Soderholm *et al.*, 1997; Bejar *et al.*, 2011a; De Braekeleer *et al.*, 2015; Wieser, 2016). Nadměrná exprese genu *EVI1* při chromozomálních přestavbách je dána buď vznikem chimérického genu nebo relokací regulačních či promotorových oblastí do jeho blízkosti (Gröschel *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015; Baldazzi *et al.*, 2016).

Mnoho studií zdůrazňuje důležitost analyzovat alterace genu *MECOM* pomocí metod FISH u pacientů s jakoukoliv abnormalitou 3q, protože přeskupení 3q26 nemusí být při konvenční cytogenetické metodě detekovatelné (tzv. kryptická aberace) a díky tomuto nálezu je zřejmé, že frekvence přestaveb genu *MECOM* je podhodnocena (Haferlach *et al.*, 2012; Baldazzi *et al.*, 2016).

Klinický obraz spojený s 3q abnormalitami je charakteristický dysmegakaryopoézou, normálním či zvýšeným počtem trombocytů a multilineární dysplazií v KD (Fonatsch *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015). Pacienti s nadměrně exprimovaným genem *EVII* mají obvykle špatnou či žádnou odpověď na konvenční chemoterapeutickou léčbu, proto se u těchto pacientů přistupuje k indikaci hypometylačních látek i pro přemostění doby do případné transplantace. Ukazuje se však, že se dlouhodobé celkové přežití zásadně nemění ani po hypometylační terapii a odpověď pacienta na tuto léčbu je velmi heterogenní. A tak je nadále jediným kurativním přístupem i u těchto pacientů pouze HSCT, jejíž indikace je limitována jen pro menšinu pacientů, a pouze 11 % pacientů po transplantaci má dožití delší než 5 let (Glass *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015; Wanquet *et al.*, 2015; Sallman *et al.*, 2020) Všechna přeskupení genu *MECOM* jsou, jak již bylo zmíněno výše, obecně spojena s velmi krátkým celkovým přežitím bez ohledu na typ léčby, což vyzdvihuje důležitost najít efektivnější terapii zaměřenou výhradně na nadměrnou expresi genu *EVII*. Jako perspektivní se jeví výzkumy terapií založených na DNA vazebných molekulách pyrol-imidazol polyamidů. V prvních fázích klinické studie jsou pak již výzkumy zaměřené na molekuly inhibitoru bromodomén cílicí na pacienty s vytvořeným super-zesilovačem díky translokaci *EVII* do blízkosti zesilovače genu *GATA2* (Zhang *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2014; Syed *et al.*, 2014; Baldazzi *et al.*, 2016; Berthon *et al.*, 2016; Sallman *et al.*, 2020).

3.3.1 Gen *EVII*

Lidský protoonkogen *EVII* zaujímá velikost přibližně 65 kb (14 z 16 exonů je kódujících). Díky přítomnosti alternativních počátků transkripce a alternativního sestřihu pre-mRNA existuje několik isoform výsledného proteinu, které jsou kódovány v rámci lokusu genu *EVII* (Glass *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015; Wieser, 2016). Nejčastější nalezenou isoformou u pacientů s myeloidními malignitami je ta o velikosti 135 kDa (přesněji 145 kDa) zobrazené na Obrázku 7 výše (chybí 188 aminokyselin, které jsou přítomny na N' konci MDS1-EVII proteinu) (Soderholm *et al.*, 1997; Glass *et al.*, 2014; Wieser, 2016). Tento transkripční faktor je nezbytný v regulaci sebeobnovy hematopoetických kmenových buněk a reguluje expresi dalších 16 cílových genů přímou vazbou na DNA (*GATA2*, *PML*...), čímž se tedy podílí nejen na fyziologické, ale i maligní krvetvorbě (De Braekeleer *et al.*, 2015; Wieser, 2016). Toto však není jediná role tohoto DNA vazebného proteinu, v několika studiích byla také prokázána jeho úloha v epigenetických regulačních procesech, kdy protein EVII přímo interaguje s enzymy podílejících se na histonové metylaci/acetylaci/deacetylaci či DNA

metylaci (Chakraborty *et al.*, 2001; Vinatzer *et al.*, 2001; Yoshimi *et al.* Kurokawa, 2011; De Braekeleer *et al.*, 2015).

Gen *EVII* tedy kóduje jaderný transkripční faktor s DNA vazebným motivem zinkových prstů, který je nadměrně exprimovaný u myeloidních malignit (u člověka v důsledku chromozomálních přestaveb a u myši retrovirovou inzerční mutagenézí, od čehož byl také v roce 1988 odvozen jeho název – Ecotropic Viral Integration Site 1) (Morishita *et al.*, 1988; Nucifora, 1997; De Braekeleer *et al.*, 2015; Wieser, 2016). Z počátku se předpokládalo, že nadměrná exprese genu *EVII* při inv(3)(q21q26) a t(3;3)(q21;26) je dána zesilovačem genu *RPNI* (Ribophorin 1), který se nachází ve zlomové oblasti 3q21 (Suzukawa *et al.*, 1994; Baldazzi *et al.*, 2016). O 20 let později však bylo prokázáno, že k ektopické expresi genu *EVII* dochází v důsledku regulace exprese distálním zesilovačem genu *GATA2* (3q21.3). Onkogenní potenciál těchto přestaveb však ale také spočívá v získané haploinsuficienci genu *GATA2* (Gröschel *et al.*, 2014; Baldazzi *et al.*, 2016). Typické zlomové body oblastí 3q21 a 3q26 jsou znázorněny na Obrázku 6 výše.

Produkt genu *EVII* interferuje také s funkcí jiných transkripčních faktorů kódovaných geny *MDS1-EVII*, *GATA1*, *RUNX1* a *PU.1*, což vede k narušení diferenciaci hematopoetických buněk (Soderholm *et al.*, 1997; Bejar *et al.*, 2011a; Yamazaki *et al.*, 2014; Wieser, 2016; Zahid *et al.*, 2017). Při pokusech na myších vedla vynucená aktivace exprese transkripčního faktoru kódovaného genem *EVII* k fenotypu MDS – zvýšila se sebeobnova hematopoetických kmenových buněk (nekontrolovatelná hyperproliferace) a došlo k narušení diferenciaci myeloidních buněk (Buonamici *et al.*, 2004; Bejar *et al.*, 2011a; Rogers *et al.*, 2014). Nadměrná exprese genu *EVII* byla také ektopicky aktivována inzercí terapeutického vektoru do lokusu genu *MECOM* u pacientů, kteří podstoupili genovou terapii a u nichž následně došlo k progresi MDS (Stein *et al.*, 2010; Bejar *et al.*, 2011a). Jakákoliv nadměrná exprese *EVII* je i bez chromozomálních přestaveb 3q26 (často doprovází pacienty s delecí 7q či alterovaným genem *MLL*) spojená s nepříznivou prognózou (Bejar *et al.*, 2011a; Rogers *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015).

3.3.2 Gen *MDS1*

Gen *MDS1* (Myelodysplastic Syndrome 1) se u člověka skládá ze 4 exonů zaujímavých genomovou oblast větší než 500 kb (De Braekeleer *et al.*, 2015; Wieser, 2016). Poslední, tedy čtvrtý exon *MDS1* a první exon *EVII* nejsou od sebe vzdáleny více než 2 kb. *MDS1* může být exprimován u zdravého jedince samostatně nebo za vzniku fúzního proteinu *MDS1-EVII*,

čímž se podílí na tvorbě již výše zmíněné PR domény. Funkce samostatného proteinu MDS1 však není doposud objasněna (Fears *et al.*, 1996; De Braekeleer *et al.*, 2015; Wieser, 2016).

3.3.3 Gen *GATA2*

Gen *GATA2* (GATA binding protein 2) lokalizovaný do oblasti 3q21.3 kóduje jaderný protein GATA2 obsahující 2 domény s DNA vazebným motivem zinkových prstů specifický k DNA sekvenci 5'-A/TGATAA/G-3' a je exprimován tkáňově specificky. Jedná se o transkripční aktivátor podílející se na správné hematopoéze, kde reguluje vývoj časných krvetvorných progenitorů a udržuje sebeobnovu kmenových buněk, čímž tedy udržuje aktivní hematopoetickou tkáň. Během maturace krevních buněk se jeho exprese snižuje. Zesilovač genu *GATA2* – G2DHE, který se nachází u lidí 110 kb (u myši 77 kb) od 5' počátku genu *GATA2*, se podílí na leukemogenezi při inv(3) a t(3;3) (zahrnující gen *MECOM*), při nichž je přemístěn gen *EVII* do jeho blízkosti a G2DHE jej následně ektopicky aktivuje. Zároveň dochází ke vzniku funkční haploinsuficience genu *GATA2*, v důsledku čehož se zvyšuje onkogenní potenciál této přestavby. Tato přestavba tak dává vzniknout typickému fenotypu spojeného s 3q26 abnormalitami (dysmegakaryopoéza a nárůst množství trombocytů). Vznik superzesilovače však vede k tvorbě potenciálního terapeutického cíle, který je namířen právě proti těmto zesilovacím komplexům (viz výše, v úvodu této podkapitoly) (Gröschel *et al.*, 2014; Yamazaki *et al.*, 2014; Collin *et al.*, 2015; Shimizu *et al.*, 2016; Yamaoka *et al.*, 2020).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky (HOK) Fakultní nemocnice Olomouc se pro cytogenetická vyšetření pacientů, u kterých je suspektní či potvrzená diagnóza myelodysplastického syndromu, ve většině případů využívají odebrané buňky kostní dřeně kultivované v režimu K24col, kdy je po celou dobu kultivace vzorku přítomen také kolcemid. Aspirát kostní dřeně je odebírán do zkumavek s protisrážlivým činidlem (heparinát lithný), ve kterých se transportuje do Cytogenetické laboratoře HOK, kde je nejdříve od tohoto činidla aspirát přečištěn a poté dále zpracováván. Jak odběr samotný, tak i manipulace se vzorkem podléhá směrnici SM 02 Příjem biologického materiálu LHOK. Výsledkem zpracování je buněčná suspenze, která se používá jak k cytogenetické analýze metodou G-pruhování, tak i k vyšetření pomocí FISH metody.

Pro vyšetření pomocí komparativní genomové hybridizace na čipu (aCGH) se využívá izolovaná DNA, která je buď izolovaná pracovníky Molekulárně-biologické laboratoře HOK FNOL jak z periferní krve, tak i kostní dřeně pacientů, a to konvenčním způsobem za využití Gentra Puregene Blood Kitu (Qiagen), nebo automatickým izolátorem nukleových kyselin s použitím MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kitu I (Roche), která je archivována v cca -80 °C. Pokud jsou k dispozici pouze fixované buňky kostní dřeně zpracované dle kultivačního protokolu K24col (uchovávané pro opakované použití při -20 °C), pak je nutno z nich DNA izolovat pomocí fenol-chloroformové metody izolace z fixovaných buněk.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- BM médium Bio-Marrow™ Karyotyping Medium, without conditioned medium (Biological Industries, kat. č. 01-199-1)
- DAPI/DuraTect-Solution, uchovávat v lednici (ZytoVision, kat. č. MT-0007-0.8)
- destilovaná voda (Cytogenetická laboratoř HOK)
- EBSS oplachovací roztok (Gibco™, kat. č. 24010043)
- ethanol 96% (Lach-Ner s.r.o., kat. č. 20025-A96)
- ethanol 96% (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. 02849)
- fenol syčený 10mmol·l⁻¹ TRISem, pH 8,0 (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. P4557)

- fluorescenčně značené sondy (Abbott Molecular Inc.): Vysis CEP 7 (D7Z1) SpectrumOrange Probe (kat. č. 06J36-007), Vysis CEP 8 (D8Z2) SpectrumGreen Probe (kat. č. 06J37-008), Vysis CEP Hybridization Buffer (kat. č. 07J36-001), uchovávat při -20 °C
- fluorescenčně značené sondy (MetaSystems): XL EVI1 (kat. č. D-5036-100-TC), XL MECOM (kat. č. D-5059-100-OG), XL t(3;3) GATA2/MECOM DF DF (kat. č. D-5124-100-OG), XL Del(5)(q31) (kat. č. D-5085-100-OG), XL Del(7)(q22q31) (kat. č. D-5068-100-TC), XL MYC amp (kat. č. D-6008-100-OG), XL MLL plus (kat. č. D-5060-100-OG), XL NUP98 (kat. č. D-5077-100-OG), XL ETV6 (kat. č. D-5073-100-OG), XL TP53/17cen (kat. č. D-5103-100-OG), XL Del(20q) plus (kat. č. D-5119-100-OG), uchovávat při -20 °C
- Gurr Buffer Tablets (Gibco™, kat. č. 10582013)
- Human Cot-1 DNA 1,0 mg·ml⁻¹ (Agilent Technologies, kat. č. 5190-3393)
- Human Reference Female DNA (Agilent Technologies, kat. č. 5190-4371)
- Human Reference Male DNA (Agilent Technologies, kat. č. 5190-4370)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. 71649)
- chlorid draselný o koncentraci 0,075 mol·l⁻¹ (lékárna FNOL)
- chloroform (Lach-Ner s.r.o., kat. č. 20034)
- imerzní olej pro mikroskopii IMMOIL-500CC (Olympus)
- injekční voda – Aqua pro iniectione (Ardeapharma, a.s.)
- isoamylalkohol (Lach-Ner s.r.o., kat. č. 20035)
- isopropanol (Lach-Ner s.r.o., kat. č. 20037)
- KaryoMAX™ Colcemid™ Solution in HBSS (Gibco™, kat. č. 15210040)
- KaryoMAX™ Giemsa Stain Solution (Gibco™, kat. č. 10092013)
- kyselina citronová monohydrát (Lachner s.r.o., kat. č. 10020)
- kyselina octová ledová (Penta, kat. č. 19990-11000)
- Leishmanovo činidlo (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. L6254)
- methanol (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. 34860)
- 2x NP-40 (Abbott Molecular Inc., kat. č. 07J05-001)
- Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 (Agilent Technologies, kat. č. 5188-5221)

- Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 (Agilent Technologies, kat. č. 5188-5222)
- PBS (připravován zásobní roztok 10x PBS, pH 7,4) (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. P3813)
- proteináza K (Qiagen, kat. č. 19131)
- RPMI-1640 médium (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. R8758)
- Rubber Cement Fixogum (Marabu, kat. č. 29010017000)
- SDS solution, 20% (Serva, kat. č. 39575)
- 20x SSC (Abbott Molecular Inc., kat. č. 02J10-032)
- STE pufr (lékárna FNOL)
- TE Buffer, 1x Molecular Biology Grade (Promega, kat. č. V6231)
- Tris-EDTA buffer solution (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. 93283)
- trypsin from porcine pancreas (Sigma Aldrich spol. s.r.o., kat. č. T4799)
- ultračištěná voda (Molekulárně-biologická laboratoř HOK)

4.2.2 Použité soupravy

- Hybridization Gasket Slide Kit (5) – 4 microarrays per slide format (Agilent Technologies, kat. č. G2534-60011)
- Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kit (Agilent Technologies, kat. č. 5188-5220)
- Qubit™ dsDNA BR Assay Kit 500r (Invitrogen, kat. č. Q32853)
- SurePrint G3 Human CGH+SNP 4x180K Kit (Agilent Technologies, kat. č. G4890A)
- SureScan slide holders Assays (Agilent Technologies, kat. č. G4900-60035)
- SureTag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies, kat. č. 5190-3399)
- SureTag DNA Labeling Kit Purification Columns (Agilent Technologies, kat. č. 5190-3391)
- 24 XCyte mFISH Kit (MetaSystems, kat. č. D-0125-120-DI)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- pracovní roztok 1x PBS:

Na přípravu 50 ml tohoto roztoku je potřeba důkladně smíchat 45 ml injekční vody s 5 ml zásobního roztoku 10x PBS.

- směs chloroform-izoamylalkohol (24:1):
Na přípravu 1 l této směsi smíchat 960 ml chloroformu se 40 ml isoamylalkoholu.
- 80% ethanol:
Na přípravu 100 ml 80% ethanolu je potřeba smíchat 83 ml 96% ethanolu se 17 ml injekční vody. Uchovávat při -20 °C.
- 70% ethanol:
Na přípravu 100 ml 70% ethanolu je potřeba smíchat 73 ml 96% ethanolu s 27 ml injekční vody. Uchovávat při -20 °C.
- 10x aCGH Blocking Agent (všechny potřebné reagenty jsou součástí Agilent Kitů zmíněných výše 4.2.2 Použité soupravy):
Do vialky obsahující lyofilizovaný 10x aCGH Blocking Agent (součástí Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kitu) přidat 1350 µl DNase/RNase-free distilled water (součástí SureTag DNA Labeling Kitu) a nechat inkubovat 1 h při laboratorní teplotě, poté zvortexovat, stočit a uskladnit při -20 °C (před každým použitím znova zvortexovat a stočit).
- Carnoye fixace:
Na přípravu 100 ml této fixace je potřeba smíchat ledovou kys. octovou a methanol v poměru 1:3, což odpovídá smíchání 25 ml ledové kys. octové se 75 ml methanolu.
- zásobní roztok 20x SSC:
132 g 20x SSC rozpustit v cca 400 ml injekční vody a upravit pH na 7,0–7,5. Poté doplnit do konečného objemu 500 ml. Uchovávat při laboratorní teplotě.
- pracovní roztok 2x SSC:
Pro přípravu 100 ml tohoto pracovního roztoku je potřeba smíchat 10 ml roztoku 20x SSC s 90 ml injekční vody (případně upravit pH na 7–7,5). Uchovávat při laboratorní teplotě.
- zásobní mycí roztok 2x SSC/0,1% NP-40:
Roztok připravit smícháním cca 100 ml 20x SSC s 850 ml injekční vody, k tomuto roztoku poté přidat 1 ml NP-40 a upravit pH na 7–7,5. Nakonec doplnit do konečného objemu 1000 ml injekční vodou. Uchovávat při laboratorní teplotě.
- zásobní mycí roztok 0,4x SSC/0,3% NP-40:
Tento roztok připravit smícháním cca 20 ml 20x SSC s 950 ml injekční vody, k tomuto roztoku poté přidat 3 ml NP-40 a upravit pH na 7–7,5. Nakonec doplnit do konečného objemu 1000 ml injekční vodou. Uchovávat při laboratorní teplotě.

- roztok $0,14\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 :
Rozpustit 25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v 500 ml destilované vody.
- roztok kyseliny citronové o koncentraci $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$:
Rozpustit 10,5 g kys. citronové v 500 ml destilované vody.
- Leishmanovo činidlo:
Rozpustit 0,6 g Leishmanova činidla ve 400 ml methanolu za stálého míchání na magnetické míchačce po dobu 4 h, poté přelit do odměrného válce a doplnit methanolem do konečného objemu 500 ml. Činidlo musí před prvním použitím zrát cca 24 h.
- Gurrův roztok (pH 6,8):
Rozpustit 1 tabletu Gurr Buffer v 1000 ml destilované vody.
- roztok trypsinu:
Rozpustit 0,04 g trypsinu v 1 ml PBS.
- barvicí roztok I:
Smíchat 75 ml $0,14\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 s 20 ml kyseliny citronové, dále přidat 0,32 ml Giemsa Karyomax a 0,5 ml roztoku trypsinu v PBS.
- barvicí roztok II:
Smíchat 15 ml Leishmannova činidla se 45 ml Gurrůva roztoku.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Laboratoř cytogenetiky a molekulární cytogenetiky a Molekulárně-biologická laboratoř HOK FNOL disponuje níže zmíněnými zařízeními a vybavením, které jsem používala při vypracovávání této diplomové práce:

- běžné počítačové vybavení
- centrifuga Biofuge 22R (Heraeus Sepatech)
- centrifuga Heraeus Megafuge 16 R (Thermo Fisher Scientific)
- CO_2 inkubátor na $37\text{ }^\circ\text{C}$ Function Line BB 16 (Heraeus Holding)
- CoolCube 1 Digital High Res. CCD kamera (MetaSystems)
- fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus)
- fluorescenční mikroskop Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss)
- fluorescenční mikroskop BX40 a BX51 (oba Olympus)
- fluorescenční skener SureScan Dx Microarray Scanner (Agilent Technologies)
- hybridizační pec Hybridization Oven (Shel Lab)

- hybridizační zařízení ThermoBrite™ StatSpin® (Abbott Molecular)
- inkubátor hybridizační IS020 (Grant Boekel)
- kahan
- kombinovaná chladnička (Indesit)
- kombinovaná chladnička (Liebherr)
- kývačka MIX30 (Tool spol. s.r.o.)
- laboratorní digestoř N 1200 a N 1500 (obě Merci)
- laboratorní váha (Scaltec Instruments)
- laminární box MSC-Advantage™ Class II Biological Safety (Thermo Fisher Scientific)
- magnetická míchačka (Schott Instruments)
- mraznička (Liebherr)
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)
- PCR termocyklér ProFlex™ 96-Well PCR System (Applied Biosystems™)
- přístroj pro přípravu preparátů Hanabi Metaphase Spreader (ADSTEC)
- přístroj Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen)
- sada jednonábových automatických mikropipet s různými objemovými rozsahy (minimální rozsah 0,5 µl a maximální 1000 µl) (Eppendorf/Gilson)
- software CytoGenomics v4.0.3.12 (Agilent Technologies)
- software Ikaros pro karyotypizaci (MetaSystems)
- software ISIS (MetaSystems)
- stolní centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf)
- stolní centrifuga s vortexem Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)
- stolní minicentrifuga (Labnet International)
- stolní minicentrifuga M-6 (Boeco Germany)
- stolní minicentrifuga MiniStar silverline (VWR)
- systém pro automatické vyhledávání mitóz Metafer4 – skenovací příslušenství a zobrazovací software (MetaSystems)
- Termoblok Dry Block Thermostat Bio TDB-100 (Biosan)
- termostat biologický BT120 Biological Thermostat (Laboratorní přístroje Praha)
- třepačka Reax top (Heidolph)
- vodní lázeň Thermomix® BM (B. Braun Biotech International)
- vortex (Labnet International)

- vyhřevná plotýnka 12801 (Medax Nagel GmbH Kiel)
- vyhřívání třepačka Thermomixer comfort (Eppendorf)
- vyhřívání vodní lázeň GFL 1012 (GFL)
- výrobce destilované vody – AQUAL[®] 29 SP proline (Aqual s.r.o.)
- výrobce ultračištěné deionizované vody Direct-Q[®] 3 UV (Millipore)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Kultivace a zpracování buněk kostní dřeně pro cytogenetická a molekulárně-cytogenetická vyšetření

Příjem biologického materiálu (BM), kultivace buněk kostní dřeně (KD) a jejich zpracování podléhá směrnici HOK FNOL (Sm-02 Příjem biologického materiálu LHOK) a standardním operačním postupům Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky (SOP_LCG_A01 Analýza karyotypu buněk nádorové tkáně konvenční cytogenetickou metodou).

Aspirát kostní dřeně je odebrán do sterilních odběrových zkumavek s heparinátém lithným a takto je transportován do Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky, kde jsou nejdříve buňky kostní dřeně přečištěny od heparinátu lithného a následně kultivovány po dobu 24 h za přítomnosti kolcemidu (mitotický jed zastavující buněčný cyklus dělicích se buněk v metafázi). Po kultivaci jsou buňky KD zpracovány klasickou metodou pro cytogenetické vyšetření buněk KD. Buněčná suspenze získaná po kultivaci a zpracování KD je uchovávána při cca 4 °C a po dokončení vyšetření je archivována při -20 °C za dodržení podmínek stanovených SOP_LCG_04 Archivace BM.

Postup přípravy kultivačního média pro KD a přečištění aspirátu KD od heparinu

1. KD vymýt od heparinu přelitím do 15ml centrifugačních zkumavek a doplněním do objemu 15 ml médiem RPMI-1640, jemným promícháním a stočením při 1000 rpm po dobu 10 min.
2. Poté supernatant slít a sediment jemně promíchat pomocí Pasteurovy pipety a přenést ho do kultivační nádoby s BM médiem.
3. Ke kultivaci poté přidat 2 kapky kolcemidu. Inkubovat při 37 °C po dobu cca 24 h.

Postup zpracování KD pro cytogenetická a molekulárně-cytogenetická vyšetření

1. Připravit si Carnoye fixační roztok a uchovávat jej v lednici.
2. Obsah kultivační nádoby přelít do označené 15ml zkumavky a stočit při 1000 rpm po dobu 10 min a při 37 °C.
3. Po stočení odstranit supernatant a přidat cca 10 ml roztoku KCl o koncentraci 0,075 mol·l⁻¹ (vytemperovaného na cca 37 °C) a nechat inkubovat v 37 °C po dobu cca 25 min.
4. Po 20min inkubaci přidat kapku vychlazené Carnoye fixace, promíchat a stočit po dobu 10 min při 1000 rpm a 37 °C.
5. Poté odstranit supernatant a k sedimentu přidat 10 ml vychlazené Carnoye fixace (první ml přidávat pomalu po kapkách), následně obsah zkumavky zvortexovat a nechat inkubovat po dobu 30 min při pokojové teplotě.
6. Po 30min inkubaci zcentrifugovat obsah zkumavky po dobu 10 min při 1000 rpm a 4 °C.
7. Poté odstranit supernatant a k sedimentu opět přidat 10 ml vychlazeného fixačního roztoku Carnoye, následně zvortexovat (centrifugaci, odstranění supernatantu a přidání fixační směsi opakovat tolikrát, dokud nedosáhneme mléčného zabarvení buněčné suspenze).
8. Takto zpracovanou buněčnou suspenzi uchovávat v lednici po dobu maximálně několika týdnů pro další zpracování a vyhodnocení vzorku.
9. Poté biologický materiál archivovat zamražením 2 ml fixované buněčné suspenze v označené mikrozkuhavce při -20 °C.

4.4.2 Příprava, barvení cytogenetických preparátů pomocí G-pruhování, karyotypizace a vyhodnocení výsledků

Metoda barvení pomocí G-pruhování umožňuje rozlišit jednotlivé chromozómové páry dle specifických G-pruhů. Metoda G-pruhování je založena na prvotním působení proteolytického enzymu trypsinu s následným působením Giemsova barviva. Takto obarvené metafázní chromozómy se vyhodnocují ve světelném mikroskopu (Pospíšilová *et al.*, 2011) s využitím systému pro automatické vyhledávání mitóz Metafer4 a počítačového karyotypizačního softwaru Ikaros (oba MetaSystems). Vyhodnocuje se 30 nasnímaných mitóz (za využití CCD kamery) pro každého pacienta, 10 z nich poté procházíme v softwaru Ikaros a manuálně skládáme do výsledných karyotypů, ve kterých hodnotíme jak počet chromozómů,

tak i jejich strukturu. Popis výsledků analýzy se řídí pravidly mezinárodní nomenklatury pro lidskou cytogenetiku – ISCN 2016 (McGowan-Jordan *et al.*, 2016).

Příprava a barvení cytogenetických preparátů G-pruhováním

1. Připravit si barvicí roztoky I a II do skleněných koptin, další koptinu s EBSS roztokem a poslední koptinu s destilovanou vodou pro oplach.
2. Na nadýchnuté podložní skličko z výšky cca 50 cm kápnout 2–3 kapky fixované buněčné suspenze, poté preparát protáhnout nad plamenem a nechat zaschnout při laboratorní teplotě (takto připravit sadu 5 skel pro každého pacienta).
3. Po zaschnutí preparát inkubovat v barvicím roztoku I po dobu 3 min při laboratorní teplotě (po jednom skle z každé sady).
4. Poté opláchnout preparát od roztoku I v koptině s EBSS roztokem a přenést do koptiny s barvicím roztokem II, kde preparát inkubovat po dobu 1 min.
5. Následně preparát opláchnout v koptině s destilovanou vodou a nechat uschnout při laboratorní teplotě.
6. Provést mikroskopické zhodnocení obarveného cytogenetického preparátu při procházejícím světle a pokud je výsledek vyhovující, obarvit všechny zbylé preparáty jednotlivých pacientů tak, abychom pro každého pacienta měli 5 obarvených preparátů (při nevyhovujícím výsledku obarvení upravit časy inkubací v jednotlivých barvicích roztocích a znova preparáty mikroskopicky vyhodnotit). Následně na obarvených preparátech provést karyotypizaci.

Karyotypování a vyhodnocení cytogenetických preparátů

1. Za využití světelného mikroskopu a systému Metafer4 vyhodnotit u každého pacienta 30 mitóz a z toho u 10 mitóz provést karyotypizaci pomocí softwaru Ikaros.
2. Výsledky analýzy popsat dle pravidel ISCN 2016 a nechat zkontrolovat vedoucím laboratoře dle Sm 03 Hlavní proces LHOK (uvolnění výsledků vyšetřovaného BM).

4.4.3 Analýza buněčných preparátů pomocí metody FISH/mFISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace je jedna z molekulárně-cytogenetických metod využívající komplementarity fluorescenčních DNA sond ke specifickým sekvencím vyšetřované DNA, což umožňuje detekci specifické sekvence jak u přítomných mitóz,

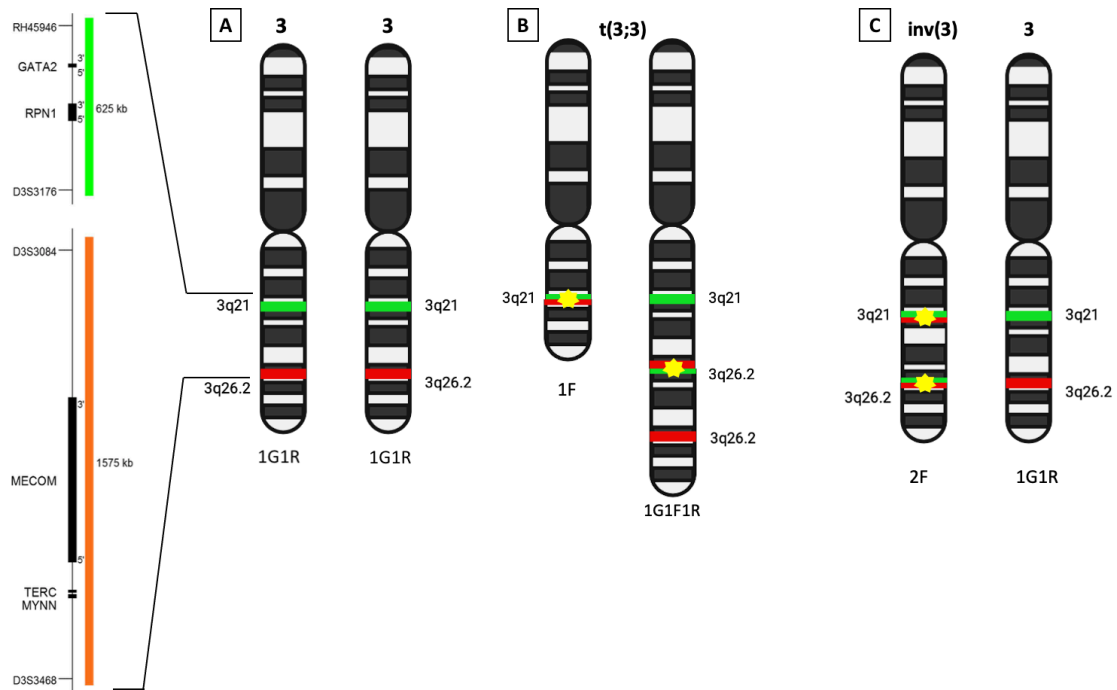
tak i v interfázních jádrech ve vzorku fixovaných buněk kostní dřeně. Konvenčně se využívá kombinace 2–3 sond značených různými fluorochromy. Sondy se rozdělují do několika podskupin dle oblastí, které detekují: lokusově specifické (LSI), centromerické (CEP), či celochromozómové (WCP) (Pospíšilová *et al.*, 2011).

Dle platných postupů se dodržuje užití tzv. panelu sond, který se používá při stanovených diagnózách a potvrzuje tak, či vyvrací předpokládané chromozómové změny. Pro vyšetření pacientů s potvrzeným či suspektním myelodysplastickým syndromem se využívají v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK převážně LSI sondy firmy MetaSystems, případně CEP sondy firmy Abbott Molecular Inc. Základní soubor sond vyšetřovaný u těchto pacientů je součástí tzv. MDS panelu, který ve výše zmíněné laboratoři běžně zahrnuje následujících 6 sond (pro analýzu 6 nejčastějších chromozómových změn spojených s MDS):

- XL MECOM MetaSystems – oranžový signál náleží oblasti 3q26 stejně jako zelený signál (zelený signál však zahrnuje distální oblast genu *MECOM* a dále také geny *TERC* a *NYNN*)
- XL Del(5)(q31) MetaSystems – oranžový signál označuje specificky oblast 5q31 jejíž součástí je gen *EGR1* a zelený signál patří oblasti 5p15
- XL Del(7)(q22q31) MetaSystems – oranžový signál náleží oblasti 7q22 zahrnující gen *KMT2E (MLL5)*, zelený signál náleží specifické oblasti 7q31 zahrnující protoonkogen *MET* a v poslední řadě modrý signál patří centromerické oblasti chromozómu 7
- XL TP53/17cen MetaSystems – oranžový signál náleží oblasti 17p13, která zahrnuje gen *TP53*, zelený signál pak přísluší oblasti centromery chromozómu 17
- XL Del(20q) plus MetaSystems – oranžově značená oblast označuje oblast 20q12 zahrnující i proximální část genu *PTPRT*, zeleně je pak označena oblast 20q13 zahrnující gen *MYBL2*
- Vysis CEP 7 (D7Z1) SpectrumOrange Probe/Vysis CEP 8 (D8Z2) SpectrumGreen Probe (Abbott Molecular Inc.) – centromera chromozómu 7 je charakterizována oranžovým signálem, zatímco centromera chromozómu 8 zeleným

Aberace 3. chromozómu u pacientů s MDS či AML jsou často spojeny s *inv(3)(q21q26)* a *t(3;3)(q21;q26)*, kdy dochází k alteraci jak genu *MECOM*, tak i genu *GATA2* (viz Obrázek 8 níže). Pro detekci či potvrzení těchto přestaveb se využívá sonda:

- XL t(3;3) GATA2/MECOM DF DF MetaSystems – oranžový signál odpovídá zlomové oblasti 3q26.2 (zahrnující gen *MECOM*), naopak zelený signál překlenuje zlomovou oblast 3q21 (zahrnující gen *GATA2* a *RPNI*)



Obrázek 8: Schématické znázornění normálních a balancovaně přestavěných 3. chromozómů analyzovaných FISH metodou s využitím translokační sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF DF (MetaSystems).

Na obrázku A je zobrazen normální nález pro oblast 3q21 a 3q26.2 (signály – 2G2R), na obrázku B je znázorněn nález t(3;3), který je charakteristický signály 2F1G1R, shodné signály jsou patrné i na obrázku C, zde se však jedná o inv(3) (upraveno dle MetaSystems Probes, 2017).

Pro podrobnější charakteristiku chromozómových aberací, stanovení translokačního partnera atd. se využívá doplňujících vyšetření pomocí dalších sond (např. WCP sondy) a metody rehybridizace FISH preparátu. Pro upřesnění komplexních změn karyotypu se pak raději volí metoda mFISH (mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace). Tato metoda je založena na využití směsi celochromozómových sond značených kombinatoricky 5 různými fluorochromy (odlišné kombinace a koncentrace jednotlivých fluorochromů). Každá kombinace fluorochromů pak odpovídá jednomu z 24 různých lidských chromozómů (22 párů autozómů, X a Y). Fluorescence dílčích fluorochromů jsou nasnímány CCD kamerou pod různými optickými filtry a následně jsou kombinace intenzit jednotlivých fluorescencí převedeny softwarově (ISIS) do odpovídajících pseudobarev (Speicher *et al.*, 1996; Kuglík, 2013). K analýze karyotypu metodou mFISH (provedenou pracovníky Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK) se využívá 24 XCyte mFISH Kit (kat. č. D-0125-120-DI, Metasystems), mitózy jsou následně automaticky vyhledány (Metafer4), nasnímány

fluorescenčním mikroskopem Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss) a vyhodnoceny v systému ISIS (MetaSystems), kdy je hodnoceno minimálně 10 mitóz. Popis výsledků analýzy se opět řídí pravidly mezinárodní nomenklatury pro lidskou cytogenetiku – ISCN 2016 (McGowan-Jordan *et al.*, 2016).

Příprava sond

1. Pro diagnostiku MDS užít 6 základních DNA sond MDS panelu. Pět z nich je připraveno k přímému použití, které stačí pouze před každým použitím rozmrazit, zvortexovat, stočit a uchovávat ve tmě.
2. Naopak směs centromerických sond je nutno připravit rozmrznutím a smícháním 7 μ l Vysis CEP hybridizačního pufru s 2 μ l injekční vody a 0,5 μ l sondy cep7 nebo cep8, poté směs zvortexovat, stočit na stolní centrifuze a uchovávat ve tmě.
3. V případě použití kombinace 2 různých WCP sond na vzorek je tyto sondy nutné nejdříve smíchat do jedné mikrozkušavky (každou sondu po 5 μ l) a až poté směs sond aplikovat na vzorek.

Příprava preparátů

1. Suspenzi fixovaných buněk KD (v Carnoye fixaci, viz kapitola 4.4.1) aplikovat vždy v množství 20–30 μ l kolmo na podložní sklíčka umístěná v Chromosome Metaphase Spreader přístroji, preparáty nechat zaschnout při zapnuté funkci sušení.
2. Do čisté koplíny připravit roztok 50 ml 2x SSC.
3. Po zaschnutí preparátů je nutné zkontrolovat ve světelném mikroskopu hustotu aplikovaných buněk a v případě nedostatku interfázních jader či mitóz lze na preparáty znovu aplikovat fixovanou buněčnou suspenzi stejného pacienta a nechat je opětovně zaschnout.
4. Po kontrole umístit preparáty do připravené koplíny s 2x SSC a nechat je tam inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 10 min.
5. Po 10min inkubaci provést odvodnění skel ve vzestupné řadě ledových alkoholů (uchovávaných při cca -20 °C), kdy je inkubovat po dobu 2 min v jednotlivých koncentracích ethanolu (70%, 80% a 96%).
6. Během odvodňování si zapnout plotýnku, kterou si nechat vytemperovat na cca 45 °C.
7. Po odvodnění preparáty nechat usušit na vytemperované plotýnce.

Kodenaturace, hybridizace a odmytí preparátů

1. Na odvodněné a vysušené preparáty napipetovat odpovídající množství připravených sond dle velikosti krycího skla (18x18 mm – 5 µl sondy, 22x22 mm – 8 µl sondy), poté přikrýt příslušným krycím sklíčkem.
2. Všechny okraje krycích sklíček překrýt rubber-cementem proti vyschnutí.
3. Poté preparáty se sondami kodenaturovat v komůrce ThermoBrite při 75 °C po dobu 2 min (pokud se jedná o směs WCP sond je nutné kodenaturovat 5 min).
4. Po kodenaturaci preparáty vložit do hybridizační komůrky (vlhké komůrky), kde ssDNA vzorků hybridizují se sondami při 37 °C do dalšího dne.
5. Další den vymýt nenavázané sondy inkubací preparátů bez krycích sklíček v mycích roztocích, a to nejdříve 2min inkubací v roztoku 0,4x SSC/0,3% NP-40 ve vodní lázni při teplotě 73 °C. Následně 2min inkubací v roztoku 2x SSC/0,1% NP-40 při laboratorní teplotě.
6. Po odmytí nechat opět preparáty usušit na vytemperované plotýnce a poté podbarvit interfázní jádra a mitózy na skle aplikací 10 µl DAPI. Následně preparáty překrýt čistými krycími sklíčky (24x24 mm).

Hodnocení

1. Po obarvení preparátů hodnotit ve fluorescenčním mikroskopu za použití příslušných fluorescenčních filtrů (dle obsažených fluorochromů v sondách) 300 jader interfázních buněk (zaznamenávat CCD kamerou snímky zastupující změny či normální nález a ukládat je do softwaru ISIS – MetaSystems).
2. V případě potřeby lze preparát analyzovat za použití systému pro automatické vyhledávání metafázi (Metafer4), který jednotlivé mitózy vyhledá, nasnímá pomocí CCD kamery a také je uloží do systému ISIS.
3. Výsledky analýzy poté popsat dle pravidel ISCN 2016.

Postup rehybridizace skel

1. Nasnímat a uložit pozice vyhledaných mitóz systémem Metafer4.
2. Následně z vyhotoveného FISH preparátu lehce sejmout krycí sklíčko a preparát inkubovat 10 min v 96% ethanolu, poté nechat uschnout na plotýnce vytemperované na cca 45 °C.
3. Dále postupovat dle celého návodu Kodenaturace, hybridizace a vymytí preparátu viz výše.

4. Hodnocení provést systémem Metafer4 a ISIS při zadání předchozích pozic nasnímaných mitóz.

4.4.4 Fenol-chloroformová izolace DNA z fixovaných buněk kostní dřene

- 1. den

1. Fixovanou směs stočit při 10 000–13 000 rpm po dobu 2–3 min.
2. Poté odstranit supernatant, sediment resuspendovat v 1 ml 1x PBS a následně centrifugovat při 10 000–13 000 rpm po dobu 2–3 min.
3. Odstranit supernatant a sediment resuspendovat v 0,5 ml ledového STE pufru.
4. Poté ke směsi přidat 15 μ l 20% SDS a 30 μ l Proteinázy K v pufru a nechat takto inkubovat v termostatu při 37 °C do dalšího dne.

- 2. den

5. Připravit si a popsat 2 čisté 1,5ml mikrokumavky (pro 1 pacienta).
6. Po inkubaci ke směsi přidat 0,5 ml chlazeného fenolu syceného 10mmol·l⁻¹ Trisem (pH 8,0), pořádně protřepat a nechat kývat na kývačce 10 min při laboratorní teplotě.
7. Během kývání si vychladit centrifugu na 4 °C.
8. Po 10min kývání směs centrifugovat po dobu 10 min při 13 000 rpm a 4–8 °C.
9. Poté více jak 2/3 vrchní vrstvy opatrně přenést Pasteurovou pipetou do připravené 1,5ml mikrokumavky, k ní přidat 0,5 ml směsi chloroform-izoamylalkohol (24:1), pořádně protřepat a nechat znovu kývat na kývačce 10 min při laboratorní teplotě.
10. Po kývání centrifugovat po dobu 10 min při 13 000 rpm a 4–8 °C.
11. Pak opět více jak 2/3 vrchní vrstvy opatrně přenést Pasteurovou pipetou do druhé připravené 1,5ml mikrokumavky, k ní přidat 0,5 ml chlazeného izopropanolu (popř. 96% ethanolu) a nechat inkubovat minimálně 10 min v mrazáku.
12. Po 10min inkubaci v mrazáku dojde ke vzniku bílého precipitátu.
13. Centrifugovat při 14 000 rpm po dobu 5 min a při 4–8 °C, poté supernatant slít na gázičku a sediment 2x promýt vychlazeným 70% ethanolem.
14. Opět centrifugovat při 14 000 rpm po dobu 5 min a při 4–8 °C, supernatant slít na gázičku, zbytek alkoholu odsát Pasteurovou pipetou a sediment DNA nechat sušit minimálně 30 min při laboratorní teplotě.

15. Po vysušení k sedimentu přidat $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris pufr (objem dle velikosti peletu – 75–100 μl) a takto nechat sediment několik hodin rozpouštět při pokojové teplotě, poté uchovávat v lednici.

4.4.5 Kvantifikace a stanovení kvality DNA

Po izolaci DNA z buněk pacientů (provedeno v Laboratoři molekulární biologie HOK FNOL) je nutné stanovit koncentraci a kvalitu takto izolovaných DNA. Kvalita izolované DNA je stanovena poměrem A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} , kdy pro vysoce kvalitní DNA bez proteinů je poměr A_{260}/A_{280} v rozmezí 1,8–2,0 a poměr $A_{260}/A_{230} > 1,0$.

Pro stanovení hodnot koncentrace a kvality DNA lze využít 2 různých přístupů, a to spektrofotometrický (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) či fluorometrický (Qubit® 2.0 Fluorometer, Invitrogen).

Spektrofotometrické stanovení – měření veškeré DNA ve vzorku

1. Jako blank použít 1,2 μl Tris pufru ($10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), proměřit a změnit typ vzorku v systému na DNA-50.
2. Následně změřit koncentraci 1,2 μl izolované DNA (v $\text{ng}/\mu\text{l}$). Zaznamenat si výsledné hodnoty koncentrace a poměry A_{260}/A_{280} s A_{260}/A_{230} , dle těchto poměrů stanovit kvalitu izolované DNA.

Fluorometrické stanovení – měření pouze dsDNA ve vzorku (s využitím soupravy Qubit™ dsDNA BR Assay Kit, Invitrogen)

1. Připravit si odpovídající počet čistých 0,5ml mikrozkušavek (dle počtu vzorků + 2 mikrozkušavky pro standardy).
2. Dále si připravit Qubit pracovní roztok smícháním 1 μl Qubit dsDNA BR reagentu se 199 μl Qubit dsDNA BR pufru na 1 vzorek, zvortexovat a stočit.
3. Poté tento Qubit pracovní roztok přepipetovat do čistých mikrozkušavek: 190 μl pro standardy a 198–199 μl pro vzorky.
4. Do mikrozkušavek pro standardy připipetovat ke Qubit pracovnímu roztoku ještě 10 μl standardu 1 nebo 2.
5. Vzorky DNA zvortexovat, stočit a poté přidat 1–2 μl vyšetřované DNA do mikrozkušavek pro vzorky s již připraveným Qubit pracovním roztokem (do celkového objemu 200 μl).
6. Vše zvortexovat, stočit a poté inkubovat při pokojové teplotě po dobu 2 min.

7. Zkalibrovat přístroj Qubit® 2.0 Fluorometer pro protokol dsDNA Broad Range assay tím, že nejdříve proměřit 1. standard ($c = 200 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a poté 2. standard ($c = 20\,000 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).
8. Po kalibraci změřit koncentrace vyšetřovaných dsDNA v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a tyto hodnoty si vždy zaznamenat.

4.4.6 Zpracování a vyhodnocení vzorků DNA metodou aCGH

Komparativní genomová hybridizace na čipu (aCGH) je jednou z dalších molekulárně-cytogenetických metod, která detekuje nebalancované změny (amplifikace, duplikace, delece či různé početní změny chromozómů), ztráty heterozygoty (LOH) nebo uniparentální dizomie (UPD) ve vyšetřovaném genomu. Při této metodě se využívá referenční DNA (Human Reference Female/Male DNA, Agilent Technologies) značená fluorescenčně Cy3 a izolované DNA pacienta značené fluorochromem Cy5. Po proběhlé hybridizaci takto značených DNA na čip (SurePrint G3 Human CGH+SNP 4x180K, Agilent Technologies) lze vyhodnotit za pomoci fluorescenčního skeneru (SureScan Dx Microarray) a algoritmů softwaru CytoGenomics (oba Agilent Technologies) poměr fluorescencí mezi referenční (Cy3) a vyšetřovanou DNA (Cy5) každého spotu mikročipu. Díky tomu lze detekovat výše zmíněné změny ve vyšetřovaném genomu (Agilent Technologies, Inc., 2019).

Jestliže vyšetřovaný genom pacienta nedisponuje žádnou změnou, je poměr intenzit obou fluorochromů $\left(\frac{\text{Cy5}}{\text{Cy3}}\right)$ roven hodnotě 1. Pokud se však ve vyšetřovaném genomu nachází jakékoliv zmnožení, bude převládat intenzita fluorochromu Cy5 (převaha pacientovy DNA). To se projeví na hodnotě poměru $\frac{\text{Cy5}}{\text{Cy3}}$ tak, že tento poměr bude vyšší než 1 (trizomie zastoupená hodnotou 1,5 tohoto poměru). Naopak v případě jakékoliv ztráty v genomu pacienta (převaha fluorochromu Cy3 značící referenční DNA) je hodnota poměru $\frac{\text{Cy5}}{\text{Cy3}}$ menší než 1 a konkrétně u monozomie je tento poměr roven hodnotě 0,5.

Pro jednodušší interpretaci analyzovaných dat (poměrů fluorescence) se využívá matematické funkce $\log_2\frac{\text{Cy5}}{\text{Cy3}}$. Pokud se tedy ve vyšetřovaném genomu nenachází žádné změny, hodnoty $\log_2\frac{\text{Cy5}}{\text{Cy3}}$ oscilují kolem hodnoty 0. Jestliže se ve vyšetřovaném genomu vyskytuje jakékoliv zmnožení, hodnoty $\log_2\frac{\text{Cy5}}{\text{Cy3}}$ budou pro tuto oblast genomu nabývat kladných hodnot (budou oscilovat kolem hodnoty $\log_2 1,5 = 0,58$). Naopak pokud je ve vyšetřovaném genomu

přítomna jakákoliv ztráta, hodnoty $\log_2 \frac{\text{Cy5}}{\text{Cy3}}$ budou pro tuto oblast genomu nabývat záporných hodnot (budou oscilovat kolem hodnoty $\log_2 0,5 = -1$).

Software tedy analyzuje veškeré odchylky od hodnoty 0 a dle jejich velikostí interpretuje závěry analýzy (Ijma, 2011). Je však vždy nutné takto interpretovaná data manuálně a vizuálně zhodnotit.

Příprava DNA (je-li k dispozici alespoň 0,5 µg DNA)

1. Připravit si PCR mikrokumavky (dle počtu vyšetřovaných vzorků), ve kterých vzorky DNA zředit (dle změřených koncentrací těchto DNA) vodou bez nukleáz tak, aby ve výsledném objemu 20,2 µl bylo 800 ng DNA (nebo minimálně 500 ng DNA).
2. Do dalších PCR mikrokumavek připravit mužskou či ženskou kontrolní DNA (dle pohlaví pacientů) smícháním 4 µl kontrolní DNA (200 ng·µl⁻¹) s 16,2 µl vody bez nukleáz (nebo dle koncentrace DNA pacienta).

Restrikční digesce DNA (využití soupravy SureTag DNA Labeling Kit)

1. Nechat rozmrznout potřebné reagenty a poté 10x pufr pro restrikční enzym a BSA zvortexovat a stočit.
2. Následně připravit Digestion Master Mix dle schématu v Tabulce 11 do 1,5ml mikrokumavky.

Tabulka 11: Složení Digestion Master Mixu.

Složka	Množství na 1 reakci [µl]	Množství na 9 reakcí ¹ [µl]
Nuclease-free H ₂ O	2,0	18,0
10x pufr pro restrikční enzym	2,6	23,4
BSA	0,2	1,8
Alu I ²	0,5	4,5
Rsa I ²	0,5	4,5
Finální objem mixu	5,8	52,2

¹ včetně nadbytku; ² uchovávat na ledu, před použitím proklepnout a lehce stočit

3. K již připraveným DNA přidat vždy 5,8 µl Digestion Master Mixu (do celkového objemu 26 µl).
4. Poté zkumavky umístit do termocykléru s nastaveným programem Restriction Agilent dle schématu v Tabulce 12, kdy dochází ke vzniku hlavně fragmentů o velikosti 200–500 bp.

Tabulka 12: Průběh Restriction Agilent programu v termocykléru.

Pořadí cyklu	Teplota cyklu	Čas cyklu
1.	37 °C	2 hod
2.	65 °C	20 min
3.	4 °C	∞

Fluorescenční značení DNA

- Po restriční digesci stočit vzorky na stolní centrifuze.
- Ke 26 µl DNA každého vzorku přidat 5 µl Random Primers a propipetovat.
- Následně zkumavky stočit, vložit do termobloku vyhřátého na 98 °C a nechat zde 3 min.
- Poté vzorky umístit na led a inkubovat po dobu 5 min.
- Během inkubace si připravit dvě 1,5ml mikrozkušavky s Labeling Master Mixem (na ledu) dle schématu v Tabulce 13. Do jedné mikrozkušavky přidat Cyanine 3 dUTP, do druhé Cyanine 5 dUTP.

Tabulka 13: Složení Labeling Master Mixu pro fluorescenční značení DNA.

Složka	Množství na 1 reakci [µl]	Množství na 4 reakce ¹ [µl]
5x DNA reakční pufr	10,00	42,50
10x dNTPs	5,00	21,25
Cy3/Cy5-dUTP	3,00	12,75
Exo-klenow ²	1,00	4,25
Finální objem mixu	19,00	80,75

¹ včetně nadbytku; ² uchovávat na ledu, před použitím proklepnout a lehce stočit

- Poté do každé mikrozkušavky s DNA přidat 19 µl Labeling Master Mixu (k DNA pacientů přidat Mix s Cy5 a ke kontrolním DNA Mix s Cy3) do celkového objemu 50 µl.
- Následně mikrozkušavky umístit do termocykléru s nastaveným programem Labeling Agilent aCGH dle schématu v Tabulce 14.

Tabulka 14: Průběh Labeling Agilent aCGH programu v termocykléru.

Pořadí cyklu	Teplota cyklu	Čas cyklu
1.	37 °C	2 hod
2.	65 °C	10 min
3.	4 °C	∞

Purifikace značené DNA (využití SureTag DNA Labeling Kit Purification Columns)

1. Připravit si počet kolonek dle počtu vzorků DNA.
2. Po fluorescenčním značení vzorky DNA stočit a každý vzorek DNA přidat do jednotlivých 2ml mikrozkuvek se 430 μl TE pufru, poté vždy celý obsah mikrozkuvky přenést na kolonku umístěnou v kolekční 2ml mikrozkuvce.
3. Takto mikrozkuvky centrifugovat při 14 000 g po dobu 10 min.
4. Přefiltrovaný roztok slít a na jednotlivé kolonky aplikovat 480 μl TE pufru. Poté opět mikrozkuvky centrifugovat při 14 000 g po dobu 10 min.
5. Kolonky přetočit do čistých mikrozkuvek a centrifugovat (zobáčky dovnitř) po dobu 1 min při 1000 g (získá cca 20–32 μl jednotlivých přečištěných vzorků DNA).

Příprava sond na čip (využití soupravy Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kit)

1. Nejdříve je nutné stanovit specifické aktivity (účinnost fluorescenčního značení) přečištěných DNA pomocí NanoDropu (vždy pipetovat 1,0 μl DNA) a níže uvedeného vzorce:

$$SA [\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}] = \frac{\text{koncentrace Cy3 nebo Cy5} [\text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}]}{\text{koncentrace DNA} [\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}]} \cdot 1000$$

2. Specifická aktivita pro vzorky značené Cy3 by se měla pohybovat v rozmezí 25–40 $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ a pro vzorky s Cy5 20–35 $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$. Na základě zjištěných specifických aktivit a pohlaví přiřadit vždy kontrolní DNA ke vzorku DNA pacienta.
3. Smíchat cca 20 μl DNA pacienta s přiřazenou kontrolní DNA do 1 společné mikrozkuvky a poté přidat 71 μl Hybridization Master Mixu, který byl připraven dle schématu v Tabulce 15 (do celkového objemu cca 111 μl).

Tabulka 15: Složení Hybridization Master Mixu.

Složka	Množství na 1 reakci [μl]	Množství na cca 4,5 reakce ¹ [μl]
Human Cot-1 DNA	5,0	22,7
10x aCGH Blocking Agent	11,0	50,0
2x HI-RPM hybridizační pufr	55,0	250,0
Finální objem mixu	71,0	322,7

¹ včetně nadbytku

4. Poté opatrně promíchat špičkou a stočit obsah mikrozkuvek. Následně mikrozkuvky umístit na 3 min do termobloku vyhřátého na 98 °C.

5. Po 3min inkubaci v 98 °C mikrozkumavky přemístit na 30 min do vodní lázně vyhřáté na 37 °C a přiklopit krabičkou proti vysvícení.
6. Poté mikrozkumavky centrifugovat po dobu 1 min při 6000 g.

Nanesení vzorků na čip (využití souprav Hybridization Gasket Slide Kit a SurePrint G3 Human CGH+SNP 4x180K Kit)

1. Do držáku umístit gasket (tj. krycí sklo mikročipu) a do každé označené oblasti napipetovat bez bublin 100 µl připravené sondy (směs kontrolní DNA a DNA pacienta). Poté na gasket přiložit mikročip tak, aby jeho aktivní strana byla v přímém kontaktu se vzorky.
2. Následně na mikročip umístit vrchní část držáku a nechat inkubovat v otáčivém inkubátoru (při 20 rpm) po dobu 24 h při 67 °C.

Odmytí čipu

1. Po 24h hybridizaci čip opatrně vyjmout z držáku a v kopolině naplněné Wash Buffer 1 odklopit čip od krycího skla. Čip poté pinzetou přemístit do stojánu umístěného v další kopolině s čistým Wash Buffer 1, kde ho ponechat 5 min při pokojové teplotě.
2. Poté stojánek s čipem přenést do kopoliny naplněné vytemperovaným Wash Buffer 2 na 37 °C a zde ho inkubovat 1 min, následně stojánek vytáhnout tak, aby se předešlo k usazení kapek.

Skenování čipu (využití SureScan slide holders Assays)

1. Čip upevnit do držáku (slide holder) aktivní stranou nahoru a poté držák zacvaknout.
2. Umístit čip v držáku do skeneru a skenovat při zvoleném protokolu AgilentG3_CGH.
3. Po naskenování získaná data dále vyhodnotit pomocí softwaru CytoGenomics v4.0.3.12 (Agilent Technologies) a výsledky popsat dle pravidel mezinárodní nomenklatury pro lidskou cytogenetiku – ISCN 2016.

5 Výsledky

Všechny praktické úkony byly provedeny dle platných směrnic a standardních operačních postupů Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky (HOK) Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL). Samozřejmostí také je, že jsem vždy pracovala v souladu s bezpečnostními zásadami laboratorní práce s biologickým materiálem. Moje práce byla rozčleněna do 3 fází.

V první fázi jsem pomocí molekulárně-cytogenetické metody FISH s využitím základního panelu sond pro vyšetření pacientů s potvrzeným či suspektním MDS prospektivně vyšetřila 30 vzorků odebraných buněk kostní dřeně kultivované v režimu K24col od 29 různých pacientů, kdy jedna pacientka pro aktivitu choroby byla vyšetřena opakovaně, a to s půlročním intervalem.

Ve druhé fázi jsem retrospektivně vyhodnotila soubor 324 pacientů, kteří byli vyšetřeni v časovém rozmezí od září roku 2000 do září roku 2020 v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL a u kterých byla potvrzena diagnóza myelodysplastického syndromu. Tento soubor zahrnoval i mnou vyšetřené pacienty a byl analyzován hlavně z důvodu dohledání pacientů s abnormalitami 3. chromozómu. Z celkového souboru 324 nemocných tak byla tato abnormalita dohledána u 17 nemocných.

Ve třetí fázi jsem poté prospektivně a retrospektivně provedla na tomto souboru 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu doplňující vyšetření FISH a aCGH.

5.1 Prospektivní analýza 30 vzorků

Já osobně jsem se podílela během vypracování své diplomové práce na rutinním vyšetření 30 vzorků od 29 různých pacientů, a to molekulárně-cytogenetickou metodou FISH s využitím základního panelu sond užívaným pro vyšetření pacientů s potvrzeným či suspektním MDS. Dva vzorky tedy odpovídaly jedné pacientce (vzorek 12 a 13), u které bylo kontrolní vyšetření provedeno po 6 měsících z důvodu podezření na progresi onemocnění. V tomto souboru 29 pacientů bylo 16 mužů (55 %) a 13 žen (45 %). Diagnóza MDS byla potvrzena u 22 pacientů (76 %), 7 pacientů pak nespĺnilo minimální kritéria pro diagnózu MDS (vzorky 24–30), to odpovídá 24 % (viz Tabulka 16 níže).

Sedm pacientů, kteří nespĺnili kritéria pro diagnózu MDS, měli konkrétně ve 4 případech klasickou cytogenetickou metodou (G-pruhování) stanovený normální karyotyp a následná FISH analýza u nich neprokázala žádnou kryptickou změnu v MDS panelu. Další pacient z této

kohorty měl pomocí G-pruhování detekovanou ztrátu chromozómu Y, následná FISH analýza v rámci MDS panelu však nenašla žádnou přídatnou změnu. U dalšího pacienta byl pak shodnou metodou pruhování prokázán komplexní karyotyp a následná FISH analýza potvrdila v rámci MDS panelu pouze trizomii 8. chromozómu, tato aberace však souvisela u tohoto pacienta s diagnózou CML. U posledního z těchto 7 pacientů s nepotvrzenou diagnózou MDS byla klasická cytogenetická analýza neúspěšná a následná FISH analýza neprokázala jakoukoliv aberaci v rámci MDS panelu.

Tabulka 16: Základní charakteristika a výsledky mnou provedené FISH analýzy 30 vzorků.

Vzorek	Pohlaví pacienta (věk při diagnóze či progresi MDS)	Závěr MDS diagnózy	CG nález	FISH								
				-5/5q-	-7/7q-	20q-	8	Delece TP53	Alterace genu <i>MECOM</i>	Počet změn v MDS panelu	Jiná změna	
1	M (61)	MDS-MLD	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	ne
2	M (72)	MDS-EB1	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	ne
3	M (71)	MDS-MLD	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	ne
4	M (65)	MDS-EB1	KK	0/1	ND	ND	1	0	0	0	2	ano
5	M (52)	MDS-EB1	KK	0	1/0	0	0	0	1	1	2	ano
6	F (62)	5q- syndrom	Z	0/1	0	0	0	0	0	0	1	ne
7	M (77)	MDS-EB2	NK	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	0	ne
8	M (73)	MDS-RS	Z	0	0	0	0	0	0	0	0	ano
9	M (40)	MDS-EB2	NK	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	ne
10	F (81)	5q- syndrom	Z	0/1	0	0	0	0	0	0	1	ne
11	M (62)	MDS-MLD	Z	0	0	0	0	0	0	0	0	ano
12	F (69 ^D)	MDS-EB2	KK	0/1	1/1	1	0	0	0	0	3	ano
13	F (69 ^P)	MDS-EB2	KK	0/1	1/1	1	0	0	1*	1*	4	ano
14	F (48)	5q- syndrom	Z	0/1	0	0	0	0	0	0	1	ne
15	F (77)	MDS-SLD	Z	0	0	1	0	0	0	0	1	ano
16	M (69)	MDS-MLD	Z	ND	1/0	ND	ND	ND	ND	ND	1	ano
17	F (65)	MDS-EB1	Z	0	0	0	1	0	0	0	1	ano
18	M (59)	MDS-EB2	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	ano
19	F (49)	MDS-MLD	KK	0	0	1	1	0	0	0	2	ano
20	M (65)	MDS-RS	UNS	0	0	0	0	0	0	0	0	ne
21	M (66)	MDS-EB2	Z	0	1/1	1	0	1	0	0	3	ano
22	F (50)	MDS-MLD	Z	0	0	0	0	0	1	1	1	ne
23	F (20)	MDS-MLD	Z	0	0	0	1	0	0	0	1	ne
24	M	nepotvrzena	Z	0	0	0	0	0	0	0	0	ano
25	F	nepotvrzena	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	ne
26	F	nepotvrzena	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	ne
27	F	nepotvrzena	KK	0	0	0	1	0	0	0	1	ano
28	M	nepotvrzena	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	ne
29	M	nepotvrzena	NK	0	0	0	ND	0	0	0	0	ne
30	F	nepotvrzena	UNS	0	0	0	0	0	0	0	0	ne

^D v době diagnózy, ^P v době progresi; CG – klasická cytogenetická analýza; MDS-SLD (myelodysplastický syndrom s unilineární dysplazií), MDS-MLD (myelodysplastický syndrom s multilineární dysplazií), MDS-EB1, 2 (myelodysplastický syndrom s excitem blastů 1, 2), MDS-RS (myelodysplastický syndrom s prstenčitými sideroblasty); NK – normální karyotyp, Z – nalezeny 1–2 změny v karyotypu, KK – nález komplexního karyotypu (> 2 abnormality), UNS – neúspěšné; 0 – normální nález, 1 – detekována změna, ND – nevyšetřeno; * na hranici hodnoty cut off sondy

5.1.1 Soubor 22 pacientů s prokázanou diagnózou MDS

V kohortě 22 pacientů s potvrzenou diagnózou MDS bylo 13 pacientů mužského a 9 pacientů ženského pohlaví. Věkové rozmezí nemocných při diagnóze MDS v rámci této kohorty se pohybovalo mezi 20–81 lety a medián byl stanoven na 65 let. Z těchto 22 pacientů bylo 7 pacientů klasifikováno jako MDS-MLD (32 %), 5 pacientů jako MDS-EB2 (23 %), 4 pacienti jako MDS-EB1 (18 %), u 3 pacientek byl prokázán 5q- syndrom (13 %), 2 pacienti byli klasifikováni jako MDS-RS (9 %) a u 1 pacientky byl diagnostikován MDS-SLD (5 %).

Klasickou cytogenetickou analýzou (G-pruhování) bylo vyšetřeno všech 22 pacientů v souboru. U 6 pacientů byl prokázán normální karyotyp (27 %), u 15 pacientů (68 %) byl prokázán karyotyp abnormální, z toho byl u 4 pacientů (18 %) s abnormálním nálezem prokázán karyotyp komplexní. U 1 pacienta (5 %) byla klasická cytogenetická analýza neúspěšná.

U všech 22 pacientů byla následně provedena analýza FISH, ať už s využitím veškerých sond MDS panelu (detekce přídatných a prognosticky významných přestaveb, sledování progresu onemocnění atd.) nebo pouze s využitím některých cílených sond (potvrzení suspektních přestaveb, sledování efektu léčby či remise/relapsu tohoto onemocnění). V rámci MDS panelu byla touto analýzou u 13 pacientů detekována aberace (v 59 %), z toho u 6 pacientů byla detekována i jiná změna mimo MDS panel (27 %). U 9 pacientů nebyla tedy FISH metodou v rámci MDS panelu detekována jakákoliv aberace, z toho u 3 pacientů (14 %) byly detekovány změny jiné.

Mezi nejčtenější aberaci v rámci MDS panelu patřila delece 5q31 vyskytující se u 5 pacientů, z toho u vzorků 6, 10 a 16 jako izolovaná aberace (tzv. 5q- syndrom). U 2 pacientů byla tato aberace detekována v rámci komplexního karyotypu (vzorek 4 a 12/13).

Dalším velmi často aberovaným chromozómem v rámci MDS panelu v této kohortě 22 pacientů byl 7. chromozóm, který byl aberován u 4 pacientů a vždy byl spojen s další přídatnou změnou (u 2 pacientů se podílel na komplexním karyotypu). U 4 pacientů byla také detekována delece 20q, která byla stejně jako aberace 7. chromozómu vždy spojená s další přídatnou změnou (u 2 pacientů v rámci komplexního karyotypu).

Trizomie 8. chromozómu byla prokázána u 4 pacientů z této kohorty a pouze v jednom případě se jednalo o izolovanou aberaci (vzorek 23). Delece v oblasti genu *TP53* byla prokázána pouze u jediného pacienta a souvisela s monozomií chromozómu 17 (vzorek 21), tato aberace byla doprovázena dalšími aberacemi (viz Tabulka 16 výše). Na základě nalezených

3 chromozómových aberací můžeme u tohoto pacienta usuzovat na komplexní přestavby karyotypu.

U 3 pacientů s prokázaným MDS pak byla detekována přestavba genu *MECOM* (tj. ve 14 %). Nález u vzorku 13 oproti nálezu ve vzorku 12 patřící totožné pacientce inklinoval k progresi onemocnění, ke kterému došlo v průběhu 6 měsíců od 1. vyšetření. Tito 3 pacienti (vzorky 5, 13 a 22) byli zahrnuti do kohorty, která byla následně detailněji analyzována (viz níže). Vzorek 5 odpovídá pacientovi M4 v dalších analýzách, vzorek 13 pak pacientce F2 a vzorek 22 pacientce F7.

V rámci komplexních karyotypů byla v MDS panelu detekována se stejnou četností (vždy u 2 pacientů) přestavba genu *MECOM*, delece 5q, monozomie 7. chromozómu, trizomie 8. chromozómu či delece 20q. U všech 4 pacientů s prokázaným komplexním karyotypem byla vždy detekována i jiná změna mimo MDS panel (viz Tabulka 16 výše).

Mimo MDS panel byla nejčastěji FISH metodou detekována aberace chromozómu 11 v oblasti genu *MLL*.

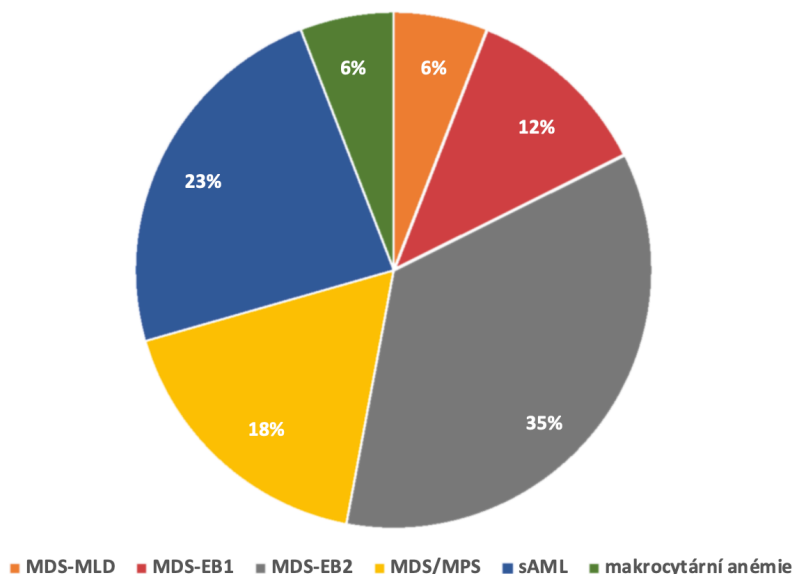
5.2 Analýza celkového souboru 324 pacientů

V celkovém souboru 324 pacientů bylo 174 mužů (54 %) a 150 žen (46 %). V tomto celkovém souboru byla abnormalita 3. chromozómu (např. translokace, inverze, duplikace, delece, monozomie chromozómu 3 atd.) prokázána (pomocí metody klasické cytogenetiky či metody FISH, popř. mFISH) u 17 pacientů, a to včetně tří mnou vyšetřených pacientů. Z celkového souboru 324 pacientů tedy tvořilo těchto 17 pacientů s abnormalitou zahrnující 3. chromozóm pouze 5 %. Věkové rozmezí celého souboru 324 nemocných s MDS při diagnóze tohoto onemocnění se pohybovalo mezi 19–87 lety a medián byl stanoven na 66 let.

5.3 Soubor pacientů s přestavbou dlouhých ramen 3. chromozómu

5.3.1 Základní charakteristika souboru

V souboru 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu bylo 9 pacientů (53 %) mužského a 8 pacientů (47 %) ženského pohlaví. Věkové rozmezí pacientů z této kohorty se při diagnóze pohybovalo mezi 36 až 73 lety a medián věku byl stanoven na 56 let. Celkové přežití výše zmíněné kohorty 17 pacientů pak bylo stanoveno na 13 měsíců (v rozmezí od 1 do 169 měsíců). Z těchto 17 pacientů bylo 6 pacientů klasifikováno jako MDS-EB2 (35 %), 2 pacienti s MDS-EB1 (12 %), 1 pacient s MDS-MLD (6 %), 3 pacienti s MDS/MPS (18 %), 4 pacienti se sekundární AML (23 %) a 1 pacient s makrocytární anémií (6 %) – viz Obrázek 9 níže.



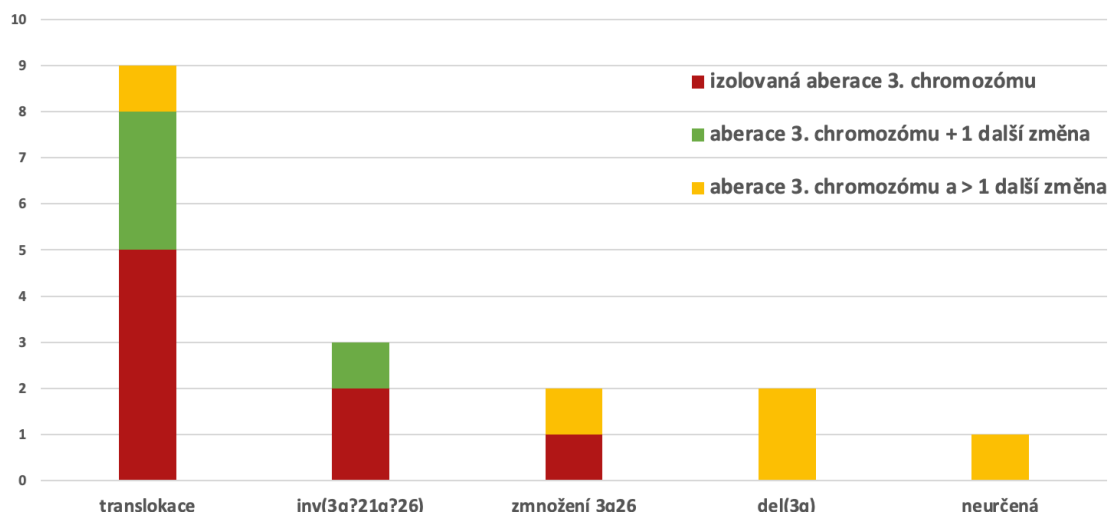
Obrázek 9: Zastoupení jednotlivých diagnóz v kohortě 17 pacientů s aberací 3. chromozómu.

MDS-MLD (myelodysplastický syndrom s multilineární dysplazií), MDS-EB1/2 (myelodysplastický syndrom s excesem blastů 1/2), MDS/MPS (myelodysplasticko-myeloproliferativní onemocnění), sAML (sekundární akutní myeloidní leukémie).

5.3.2 Výsledky klasické cytogenetické a molekulárně-cytogenetické (FISH/mFISH) analýzy 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu

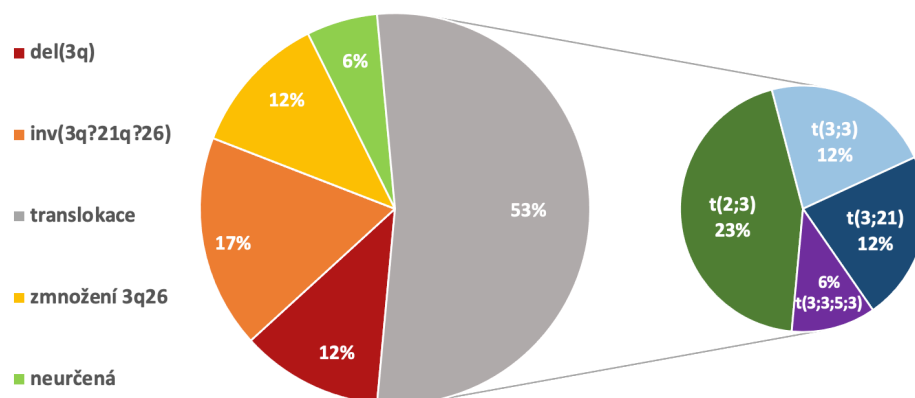
Klasickou cytogenetickou analýzou (G-pruhování) bylo vyšetřeno všech 17 pacientů v souboru. U dvou pacientů byl prokázán normální karyotyp (12 %), u 15 pacientů (88 %) byl prokázán karyotyp abnormální, z toho byl u 5 pacientů (29 %) s abnormálním karyotypem prokázán komplexní karyotyp. U těchto pacientů s komplexním karyotypem byla následně provedena mFISH analýza pro zpřesnění nálezu komplexních změn (určení translokačních partnerů, oblastí zlomů atd.).

U všech 17 pacientů byla provedena FISH analýza, ať už s využitím veškerých sond MDS panelu nebo pouze s využitím cílených sond pro potvrzení suspektních přestaveb. U 4 z 5 pacientů s cytogeneticky prokázaným komplexním karyotypem byla pro upřesnění chromozómových aberací a k detekci translokačních partnerů provedena mFISH (pacienti M4, F1, F4 a F5). U 8 pacientů (M1, M2, M3, M5, M7, M8, F7 a F8) byla v kombinaci s FISH analýzou detekována izolovaná aberace 3. chromozómu, což odpovídá 47 %. Zbylí 4 pacienti (24 %) měli kromě aberace postihující 3. chromozóm 1 další chromozómovou aberaci, z nichž se ve dvou případech jednalo o monozomii 7. chromozómu (pacienti M6 a F6). Z aberací postihující 3. chromozóm byla nejčastěji zastoupena translokace, která se vyskytovala u 9 pacientů (53 %), druhou nejčastější pak byla inverze v oblasti dlouhého ramene 3. chromozómu vyskytující se u 3 pacientů (17 %) viz Obrázek 10 a 11 níže.



Obrázek 10: Výskyt aberace 3. chromozómu izolovaně, s 1 přídatnou změnou či v rámci komplexního karyotypu vztažený k jednotlivým chromozomálním aberacím 3. chromozómu stanovených v kohortě 17 pacientů.

U 15 nemocných (88 %) byly abnormality 3. chromozómu detekovány již v době diagnózy onemocnění, zatímco u 2 pacientů (M5 a F2), to je ve 12 %, byla přestavba genu *MECOM* spojená s abnormalitou 3. chromozómu prokázána až v kontrolním odběru v souvislosti s progresí onemocnění. Metoda FISH s malovacími sondami, případně mFISH detekovala chromozómy vstupující do translokace s chromozómem 3 za účasti přestavby genu *MECOM*. Mezi nejčastější aberaci postihující 3. chromozóm patřila $t(2;3)$, která se vyskytovala u 4 pacientů (tj. 23 %), z toho u 2 pacientů se jednalo o izolovanou změnu (pacient M2 a F7), zatímco u zbylých 2 pacientů byla tato translokace doprovázena 1 další přídatnou změnou (pacienti M9 a F3). V případě pacientky F3 se jednalo o přídatnou $t(2;4)$, kdežto u pacienta M9 se jednalo o $del(5q)$. Druhou nejčastější přestavbou byly inverze zahrnující lokus genu *MECOM* prokázané u 3 pacientů (M6, M7 a M8) viz Obrázek 11 níže. U pacienta M6 byla tato inverze doprovázena i nálezem monozomie 7. chromozómu, zatímco u pacientů M7 a M8 byla inverze izolovanou přestavbou.



Obrázek 11: Zastoupení jednotlivých aberací 3. chromozómu v kohortě 17 pacientů.

Mezi další nalezené přestavby patřily: t(3;3) diagnostikována u 2 pacientů (M3 a F6), t(3;21) prokázána také u 2 pacientů (M5 a F8), t(3;3;5;3) nalezena u pacienta M4 v rámci komplexního karyotypu, delece v oblasti 3q prokázána u pacientek F1 a F4, kdy u obou těchto pacientek byla tato delece také součástí komplexních přestaveb karyotypu. V případě pacientky F1 byla tato delece spojena s delecí oblasti 3q26, zatímco u pacientky F4 nebylo možné jednoznačně určit deletovanou oblast, ta byla stanovena až po využití cílené translokační sondy t(3;3) GATA2/MECOM DF viz níže. Další nalezenou nebalancovanou aberací bylo zmnožení oblasti 3q26, které bylo přítomné u 2 pacientů (M1 a F5), kdy u pacienta M1 se jednalo o duplikaci této oblasti, která ležela pod normální nepřestavěnou oblastí 3q26. U pacientky F5 se poté jednalo o triplikaci 3q26, kdy zmnožená oblast 3q26 byla translokována na derivovaný 1. a 5. chromozóm.

V rámci komplexních karyotypů s nálezem aberantního 3. chromozómu (přítomný u pacientů M4, F1, F2, F4 a F5) byla jako nejčastější přídatná aberace stanovena delece 5q31 nacházející se u 4 z těchto pacientů (v 80 %), se stejnou frekvencí se nacházely i aberace chromozómu 7, které zahrnovaly monozomii tohoto chromozómu nebo pouze delecí 7q31. Souběh delece 5q31 a aberace 7. chromozómu se pak vyskytoval u 3 z těchto 5 pacientů s komplexním karyotypem (konkrétně u pacientek F1, F2 a F4). Vždy byly tyto výše zmíněné aberace doprovázeny dalšími heterogenními chromozomálními přestavbami.

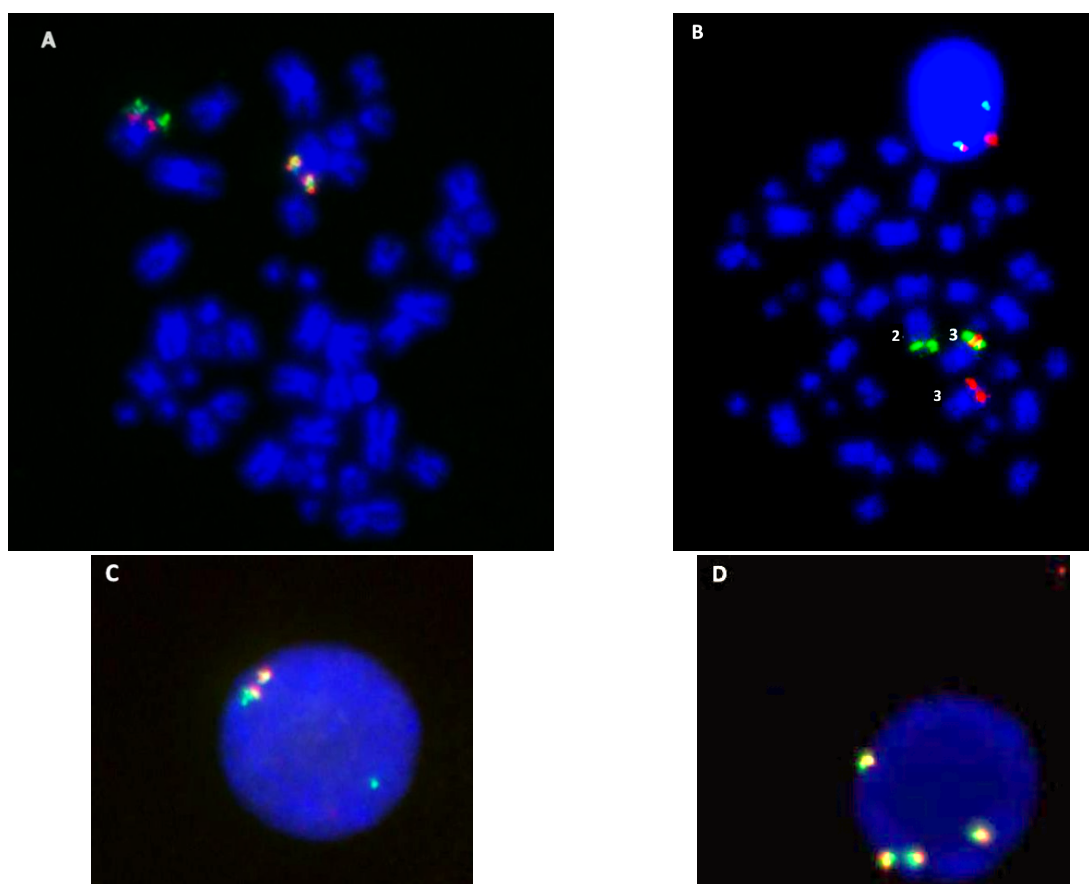
Souhrnné výsledky klasické cytogenetické analýzy a analýzy metodou FISH (popř. mFISH) provedené u těchto 17 pacientů jsou zaznamenány níže v Tabulce 17.

Tabulka 17: Základní charakteristika souboru 17 pacientů s aberacemi 3. chromozómu zároveň doplněná o výsledky klasické cytogenetické analýzy a metody FISH/mFISH.

Pohlaví + pořadí	Věk při diagnóze	Závěr DG	Přežívání k 3/2021 nebo k exitu [měsíce]	Vyšetřený materiál	CG nález	Závěrečný karyotyp CG	FISH							Konkrétní aberace 3. chromozómu po CG a FISH/mFISH analýze	
							-5/5q-	-7/7q-	20q-	8	Delece TP53	inv(3) nebo t(3;V) nebo MECOM	Počet změn v MDS panelu		Jiná změna
M1	73	MDS-EB1	18	KD	Z	46,XY,add(3q)[14]	0	0	0	0	0	1	1	0	dup(3)(q?24qter)
M2	40	MDS-EB2	103	KD	NK	46,XY[7]	0	ND	ND	ND	ND	1	1	0	t(2;3)(p?16;q26.2)
M3	44	MDS-EB2	169	KD	Z	46,XY,t(3;3)[14]/46,XX[23]	0	0	0	0	0	1	1	0	t(3;3)(q26.2;q26.1)
M4	52	MDS-EB1	11	KD	KK	44,XY,-3,?der(5),-7,-9,+mar[27]/46,XY[2]	0	1/0	0	0	0	1	2	++	t(3;3;5;3)(p?24;q?26;q?23;p?24), ztráta centromery 3
M5	64	MDS/MPS	5	KD	Z	46,XY[29]/46,XY,der(3)[1]	0	0	0	0	ND	1	1	0	t(3;21)(q26;q?22)
M6	44	sAML	1	KD	Z	45,XY,?inv(3),-7[13]/46,XY[2]	ND	1/0	ND	ND	ND	1	2	0	inv(3)-parac.
M7	68	sAML	9	PK	NK	46,XY[10]	0	0	0	0	0	1	1	0	inv(3)(q?21q26)
M8	51	MDS-EB2	9	KD	Z	46,XY,inv(3)[32]	0	0	0	0	0	1	1	0	inv(3)-parac.
M9	36	MDS/MPS	13	KD	Z	46,XY,der(2),der(3),del(5q)[18]	0/1	0	0	0	0	1	2	0	t(2;3)(p?21;q26)
F1	71	MDS-EB2	9	KD	KK	43-44,XX,?der(3),-5,-7,-21,+1-2mar[cp9]/46,XX[30]	0/1	0/1	0	0	0	1	3	++	der(3)t(3;5)del(3q26)
F2	69	MDS-EB2	13	KD	KK	44-45,XX,del(7)(q),add(8)(q),-11,del(15)(q),?der(17),-?20,+r[cp13]/46,XX[1]/5 mitóz s až 100 chromozómy	0/1	1/1	1	0	1	1*	3	++	?
F3	71	MDS/MPS	48	KD	Z	46,XX,?der(2),add(3)(q)[15]	0	0	0	0	0	1	1	+	t(2;3)(p?22;q26.2)
F4	64	sAML	12	KD	KK	42-48,XX,komplexní změny[16]/80-88,XX,komplexní změny[3]	0/1	1/1	0	0	0	ND	2	++	der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter)
F5	56	MA	1	KD	KK	46,XX,der(1),der(5).-17,+mar[20]	0/1	0	0	0	0	1	2	++	trp(3)(q26)
F6	58	sAML	50	KD	Z	45,XX,t(3;3),-7[3]/46,XX,t(3;3)[9]/46,XX[5]	ND	1/0	ND	ND	ND	1	2	0	t(3;3)(q26.2;q26.1)
F7	50	MDS-MLD	71	KD	Z	46,XX,t(2;3)(p?;q?)[26]/46,XX[4]	0	0	0	0	0	1	1	0	t(2;3)(p?;q26)
F8	54	MDS-EB2	144	KD	Z	46,XX[8]/46,XX,?add(21)[2]/46,XX,?add(2q),?3q-,?add(21)[3]	0	0	0	0	0	1	1	+	t(3;21)(q26.2;q22)

DG – diagnózy; CG – klasická cytogenetická analýza; MDS-MLD (myelodysplastický syndrom s multilineární dysplazií), MDS-EB1, 2 (myelodysplastický syndrom s excesem blastů 1, 2), MDS/MPS (myelodysplasticko-myeloproliferativní onemocnění), sAML (sekundární akutní myeloidní leukémie, MA (makrocytární anémie); KD – kostní dřev, PK – periferní krev; NK – normální karyotyp, Z – nalezeny 1–2 změny v karyotypu, KK – nález komplexního karyotypu; 0 – normální nález, 1 – detekována změna, ND – nevyšetřeno; * na hranici hodnoty cut off sondy; + nález 1 jiné změny, ++ nález > 1 jiné změny

Souhrnně byla tedy přestavba genu *MECOM* prokázána při využití sondy XL *MECOM* (MetaSystems) u 13 pacientů z kohorty 17 pacientů, což odpovídá 76 %. Tyto přestavby byly spojené s translokacemi či inverzemi (viz Obrázek 12A/B/C) a u jedné pacientky (F2) se konkrétní aberace zapojená do přestavby genu *MECOM* nepodařila jednoznačně určit. Nález zmnožené oblasti 3q26 při využití shodné sondy byl přítomný u 2 pacientů (M1 a F5 – viz Obrázek 12D). Delece 3q26 pak byla pomocí výše zmíněné sondy prokázána u jediné pacientky (F1). U pacientky F4 nebyla v době diagnózy provedena FISH analýza sondou cílenou na přestavbu genu *MECOM*, ale z důvodu vícečetných přestaveb 3. chromozómu prokázaných mFISH analýzou, byla tato pacientka retrospektivně dovyšetřena na suspektní přestavbu tohoto genu za využití sondy t(3;3) GATA2/*MECOM* DF. Užitím této sondy jsem detekovala del(3q21), ale nepotvrdila jsem přestavbu genu *MECOM* (viz Obrázek 13A níže).



Obrázek 12: Snímky výsledků FISH analýzy na interfázních jádrech a mitózách při využití sondy XL *MECOM* (MetaSystems) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu při 1000x zvětšení.

U XL *MECOM* sondy červený signál náleží oblasti 3q26 stejně jako zelený signál (červený signál odpovídá proximální části genu *MECOM*, zelený signál pak zahrnuje distální oblast genu *MECOM* a dále také geny *TERC* a *NYNN*). Normální nález je tedy charakteristický 2 fúzními signály (2F). Obr. A odpovídá mitóze ve vzorku M7 s přítomnými signály 1F1G1R, což svědčí o zapojení genu *MECOM* do přestavby v rámci inv(3)(q). Obr. B pak odpovídá nález u pacientky F3, kdy jsou patrné signály 1F1G1R, což značí přestavbu genu *MECOM* spojenou s t(2;3). Obr. C odpovídá nález u pacienta M2 s prokázanou přestavbou lokusu genu *MECOM*, která je součástí t(2;3). Obr. D odpovídá nález u pacientky F5, kdy jsou patrné 4F, které detekují triplikaci oblasti 3q26.2 (foto: Adéla Rubešová).

5.4 Podrobnější analýza souboru 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu

U 9 pacientů z této kohorty 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu byla pro potvrzení či objasnění zlomových oblastí provedena FISH analýza s využitím duální fúzní sondy, která překrývá jak oblast jednoho fúzního partnera 3q21 (oblast zahrnující geny *GATA2* a *RPNI*), tak i oblast druhého fúzního partnera 3q26 (zahrnující lokus genu *MECOM*) využívanou pro detekci t(3;3) a inverze v oblasti 3q.

Následně byla u 15 pacientů z výše zmíněné kohorty retrospektivně dohledána DNA archivovaná v -80 °C, která byla izolována pracovníky Molekulárně-biologické laboratoře HOK FNOL jak z periferní krve, tak i kostní dřeně pacientů konvenčním způsobem. U zbylých 2 pacientek z této kohorty nebyla k dispozici archivovaná DNA a bylo tedy potřeba retrospektivně dohledat suspenze buněk kostní dřeně zpracované dle kultivačního protokolu K24col (uchovávané pro opakované použití při -20 °C) a z nich jsem následně izolovala DNA za využití fenol-chloroformové metody izolace DNA z fixovaných buněk. Všech sedmnáct izolovaných DNA jsem následně podrobila citlivější molekulárně-cytogenetické analýze k detekci nebalancovaných genetických změn, a to komparativní genomové hybridizací na čipu (aCGH).

5.4.1 Výsledky FISH analýzy s využitím cílené translokační sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF

U 9 pacientů (M3, M4, M6–M8, F2–F4 a F6) z původní kohorty 17 pacientů byla provedena FISH analýza s využitím duální fúzní sondy, která se využívá pro detekci t(3;3) a inverzí v oblasti 3q. U 5 z těchto 9 pacientů byla již dříve prokázána jedna z těchto výše zmíněných přestaveb, konkrétně u pacientů M3 a F6 se jednalo o t(3;3) a u pacientů M6, M7 a M8 o inv(3). U 4 zbylých pacientů byly již dříve prokázány jiné přestavby se suspektním zapojením právě těchto zlomových oblastí.

U 8 pacientů byla díky užití této sondy zpřesněna aberace postihující 3. chromozóm (tj. v 89 %) a byla tedy u nich přínosem (viz Tabulka 18 níže).

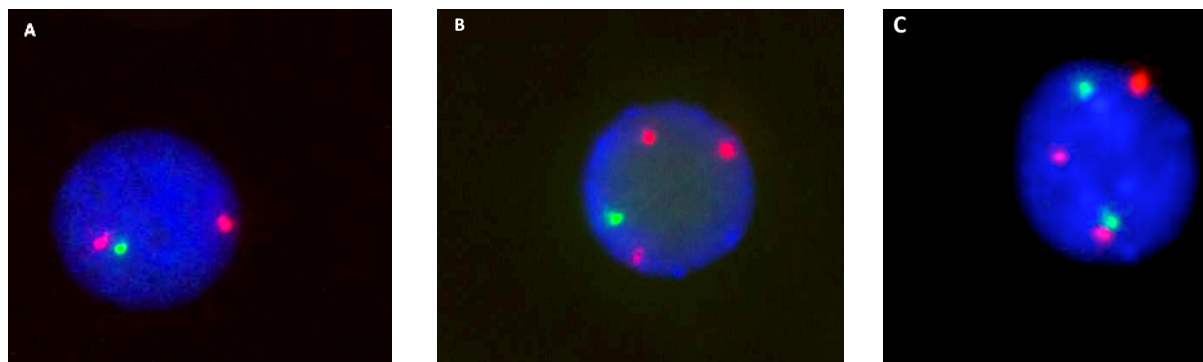
U pacientky F2 ani při použití této cílené sondy nebylo možné jednoznačně stanovit přítomnost konkrétní přestavby, jelikož se nález pohyboval pod hranicí hodnoty cut off použité sondy. Naopak u pacientky F4 byla přesnější aberace stanovena právě až po využití cílené translokační sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF, kdy byla detekována intersticiální delece oblasti zahrnující gen *GATA2* a *RPNI* (viz Obrázek 13A).

Tabulka 18: Shrnutí jednotlivých přestaveb 3. chromozómu po FISH/mFISH analýze a po FISH s využitím translokační sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF.

Pacient	Závěr přestavby před využitím cílené translokační sondy	Výsledek FISH analýzy při využití translokační sondy t(3;3)	Závěr přestavby po využití t(3;3) GATA2/MECOM DF sondy
M3	t(3;3)(q26.2;q26.1)	2F1G1R	t(3;3)(q21;q26.2)
M4	t(3;3;5;3)(p?24;q?26;q?23;p?24), ztráta centromery 3	2G3R*	t(3;3;5;3)(p?24;q26.2;q?23;p?24)
M6	inv(3)-parac.	2F1G1R	inv(3)(q21q26.2)
M7	inv(3)(q?21q26)	1F1G2R	inv(3)(q21q26.2)
M8	inv(3)-parac.	2F1G1R	inv(3)(q21q26.2)
F2	?	?	?
F3	t(2;3)(p?22;q26.2)	1G3R	t(2;3)(p?22;q26.2)del(3q21)
F4	der(3;5)(3pter→3q?12::5p11→5q?12::3q?13→3qter)	1G2R	intersticiální delecce zahrnující oblast 3q21
F6	t(3;3)(q26.2;q26.1)	2F1G1R	t(3;3)(q21;q26.2)

F – fúzní žlutý signál, G – zelený signál, R – červený signál; * viz Obrázek 13C

U pacientky F3 byla tato analýza provedena pro ověření výsledku stanoveného na základě dřívější aCGH analýzy, která našla delecí v oblasti 3q21.3 až 3q22.1, která obsahuje gen *GATA2* a *RPNI* (viz Obrázek 17A níže). Pomocí cílené FISH analýzy s využitím sondy t(3;3) GATA2/MECOM byl tento výsledek pouze potvrzen, kdy došlo nejen k přestavbě genu *MECOM* v rámci t(2;3), ale byla potvrzena i delecce oblasti 3q21 (viz Obrázek 13B).

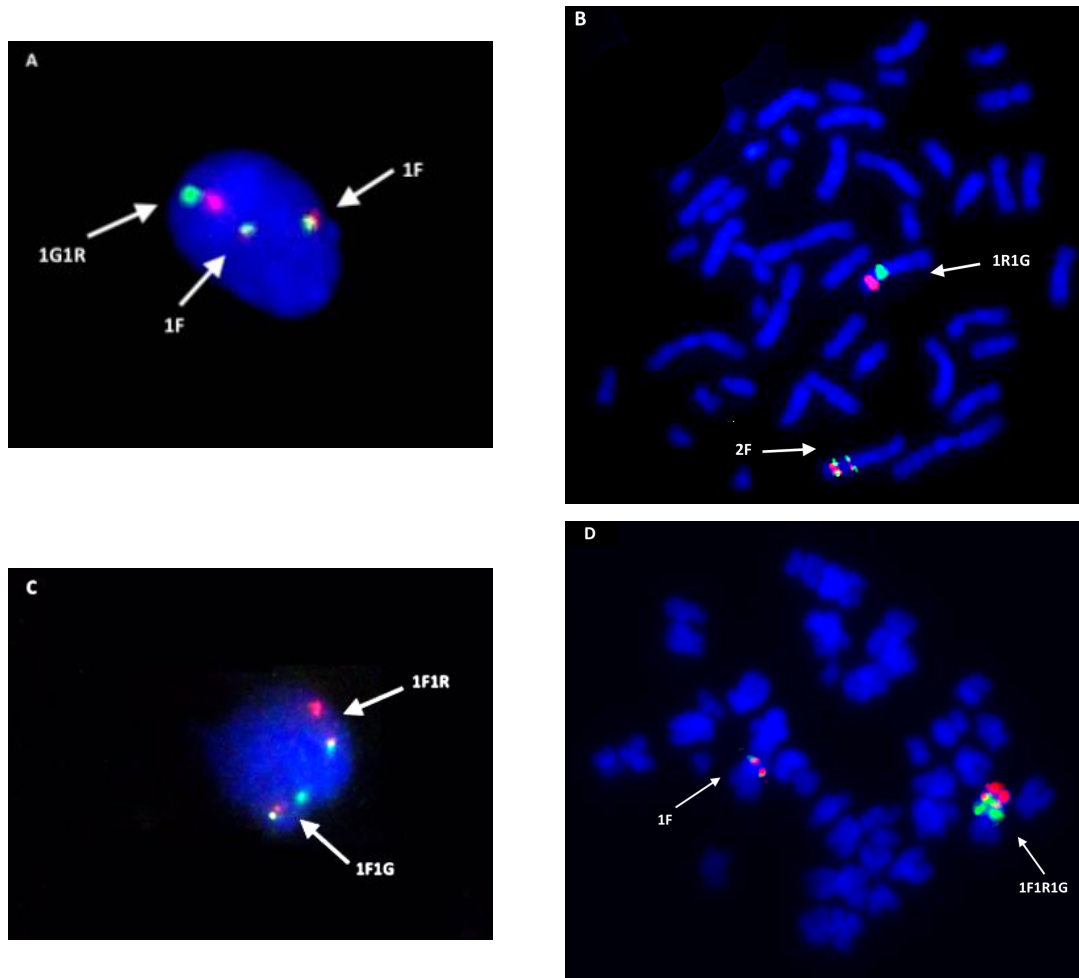


Obrázek 13: Snímky výsledků FISH analýzy na interfázních jádrech při využití sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF DF (MetaSystems) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu při 1000x zvětšení.

Zeleně je označena oblast 3q21 (zahrnuje *GATA2* a *RPNI*), červeně pak oblast 3q26 (zahrnuje gen *MECOM*). Obrázek A odpovídá vzorku pacientky F4 s přítomnými signály 1G2R, což značí na intersticiální delecí oblasti 3q21. Na obrázku B je pak znázorněn výsledek analýzy pacientky F3, kdy jsou patrné signály 1G3R, což odpovídá přestavbě genu *MECOM* a delecí oblasti 3q21, jejíž součástí je gen *GATA2* a *RPNI*. Obrázek C pak znázorňuje výsledek FISH analýzy vzorku pacienta M4, kde byly detekovány signály 2G3R, které odpovídají přestavbě genu *MECOM* v rámci translokace t(3;3;5;3) (foto: Adéla Rubešová).

Důležité při této analýze bylo, aby ve vyšetřovaných preparátech byly přítomny i mitózy, jelikož signály odpovídající nálezům t(3;3)(q21;q26.2) a inv(3)(q21q26.2) jsou v interfázních

buňkách shodné a tudíž od sebe nerozlišitelné (rozdíl je schematicky zobrazen na Obrázku 8 viz výše, výsledky FISH analýzy jsou poté zobrazeny na Obrázku 14 níže).



Obrázek 14: Snímky výsledků FISH analýzy na interfázních jádrech a mitózách při využití sondy XL t(3;3) GATA2/MECOM DF DF (MetaSystems) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu při 1000x zvětšení.

Zeleně je označena oblast 3q21 (zahrnuje *GATA2* a *RPNI*), červeně pak oblast 3q26 (zahrnuje gen *MECOM*). Přítomnost 2 fúzních signálů na jednom 3. chromozómu svědčí pro inv(3)(q21q26.2), naopak přítomnost 2 fúzních signálů na odlišných 3. chromozómech značí na t(3;3)(q21;q26.2). Obrázek A odpovídá interfáznímu jádru ze vzorku buněk pacienta M8 s přítomnými signály 2F1G1R, což by mohlo svědčit jak pro inv(3)(q21q26.2), tak i t(3;3)(q21;q26.2). Obr. B pak odpovídá stejnému pacientovi, kde je na mitóze již patrné, že se jedná o inv(3)(q21q26.2) (shodný nálezn měl i pacient M6). Obr. C odpovídá nálezu na interfázním jádře u pacientky F6, kdy jsou opět patrné signály 2F1G1R. Obr. D odpovídá stejné pacientce, kde se na přítomné mitóze dá již s jistotou stanovit výsledek t(3;3)(q21;q26.2) – shodný nálezn byl i u pacienta M3 (foto: Adéla Rubešová).

5.4.2 Výsledky molekulárně-cytogenetické analýzy aCGH

U všech 17 pacientů byla následně provedena citlivější molekulárně-cytogenetická analýza metodou komparativní genomové hybridizace na čipu (dále jen aCGH), která vedla k upřesnění aberací 3. chromozómu pouze u 6 pacientů (tj. u 35 %). Menší přínos této metody pro zpřesnění aberací 3. chromozómů je vysvětlen tím, že obecně abnormality genu *MECOM* jsou spojeny s balancovanými přestavbami, které není schopna tato metoda detekovat.

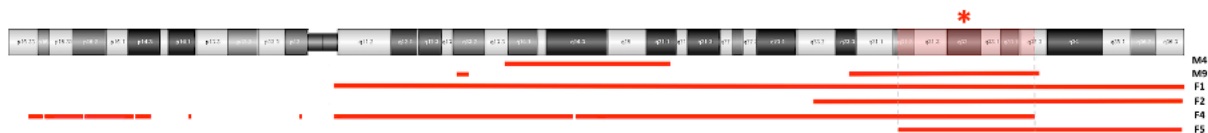
U 9 pacientů však byly metodou aCGH prokázány další přídatné změny, ať už v rámci MDS panelu nebo mimo něj (viz Tabulka 19 níže). Normální nálezy metodou aCGH byl stanoven pouze u 3 pacientů (M2, M3 a F8). Souhrnné výsledky aCGH analýzy jsou zaznamenány v Tabulce 21 níže.

Tabulka 19: Souhrn přínosů jednotlivých analýz provedených na kohortě 17 pacientů s aberací 3. chromozómu.

Pacient	CG nálezy	Nález přídatné změny metodou FISH		BM pro izolaci DNA k aCGH analýze	Nález přídatné změny metodou aCGH*		Zpřesnění aberace 3. chromozómu aCGH analýzou?
		v rámci MDS panelu	mimo MDS panel		v rámci MDS panelu	mimo MDS panel	
M1	1	0	0	PK	0	0	ano
M2	0	1	0	KD	0	0	ne
M3	1	0	0	externí DNA	0	0	ne
M4	1	0	0	PK	0	1	ne
M5	1	0	0	KD	LOH	1	ne
M6	1	0	0	PK	0	0	ne
M7	0	1	0	PK	1	0	ano
M8	1	0	0	PK	0	1	ne
M9	1	0	0	KD	0	0	ne
F1	1	1	1	PK	1	1	ano
F2	1	1	1	KD	1	1	ne
F3	1	1	1	PK	0	1	ano
F4	1	1	1	KD	1	1	ano
F5	1	1	1	fixované buňky KD	1	1	ano
F6	1	0	0	KD	0	0	ne
F7	1	0	0	fixované buňky KD	0	0	ne
F8	1	0	0	KD	0	0	ne

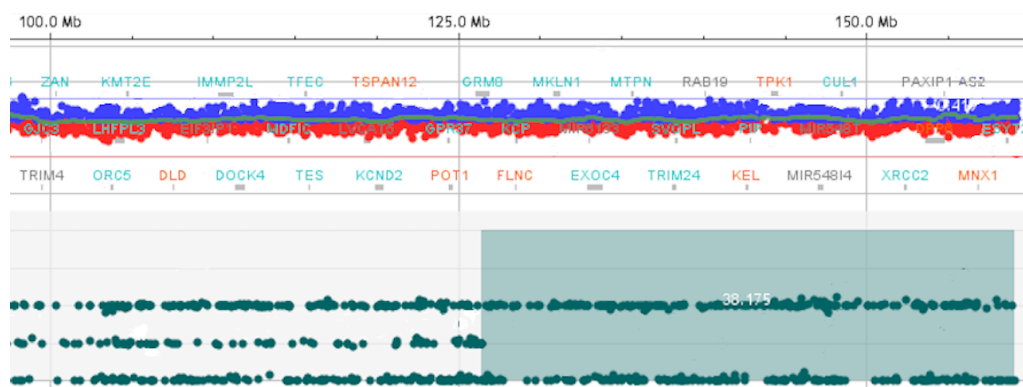
CG – klasická cytogenetická analýza; BM – biologický materiál; 0 – normální nálezy, 1 – nalezena změna karyotypu; KD – kostní dřev, PK – periferní krev; LOH – ztráta heterozygoty; * vztahuje se pouze na LOH nalezených v rámci MDS panelu

Nejčastěji nebalancovaně přestavěným chromozómem (vyjma 3. chromozómu) byl chromozóm 7 v rámci kohorty 17 pacientů, který byl dle aCGH postižen u 6 pacientů (M4, M5, M6, M8, F1, F2 a F6). U pacienta M8 se konkrétně jednalo o delecii oblasti genu *IKZF1* (transkripční regulátor). Přítomnost nebalancované aberace 7. chromozómu měla být přítomna dle FISH analýzy i u pacientky F4, tento nálezy však aCGH analýza nepotvrdila, a to kvůli nízkému zastoupení patologických klonů s touto aberací ve vzorku DNA, které bylo pod detekčním limitem této metody. Druhým nejčastějším nebalancovaně přestavěným chromozómem (kromě 3. chromozómu) byl chromozóm 5, u kterého byla v 6 případech detekována různě rozsáhlá delecie v oblasti 5q (M4, M9, F1, F2, F4 a F5). V rámci těchto delecí byla stanovena tzv. CDR do oblasti 5q31.2q33.3 viz Obrázek 15 níže. Třetím nejčastěji zasaženým chromozómem (kromě 3. chromozómu) dle aCGH analýzy byl 17. chromozóm.



Obrázek 15: Distribuce delecí v rámci 5. chromozómu identifikovaných aCGH analýzou u 6 pacientů s aberací 3. chromozómu. * označeno CDR – 5q31.2q33.3

Nejčastější přídatnou změnou nově nalezenou mimo MDS panel u výše zmíněné kohorty byla delece v oblasti genu *NFI*, která se nacházela u pacientů M5, F1 a F4 (tj. v 18 %). U pacientek F1 a F4 byla tato delece součástí komplexních změn karyotypu, na kterém se podílela i delece 5q11.1q33.3 a u pacientky F1 byla doprovázená ještě delecí 7q. U pacienta M5 sice nebyla nalezena del(5q), byla však prokázána ztráta heterozygoty v oblasti zahrnující gen epigenetického modulátoru *EZH2* (viz Obrázek 16 níže).

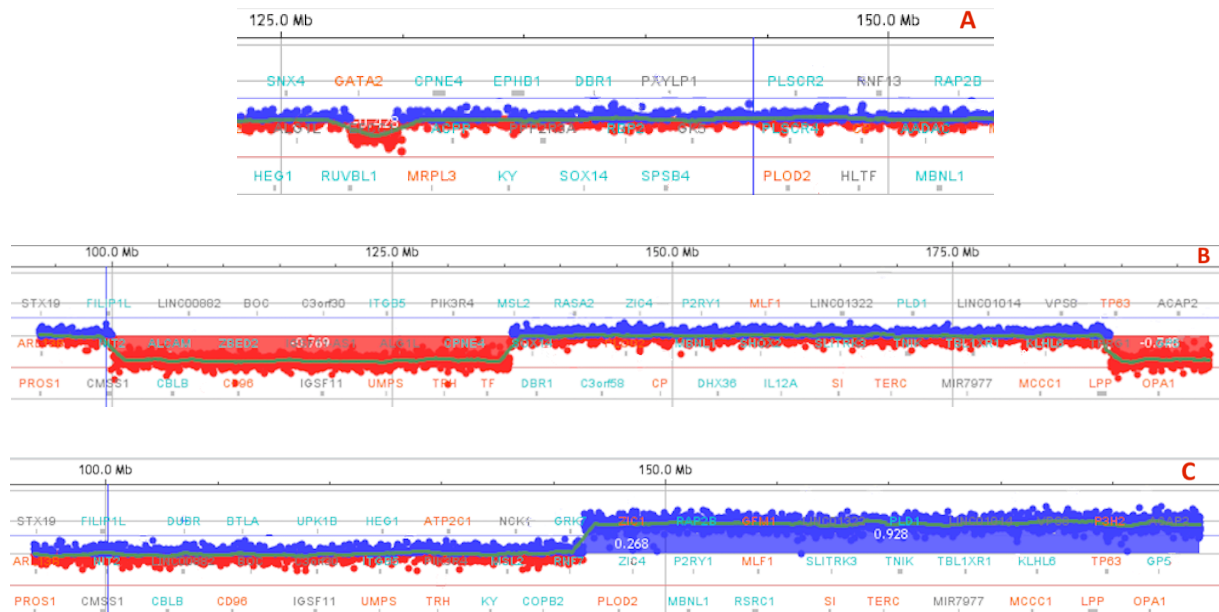


Obrázek 16: Ztráta heterozygoty v oblasti 7q31.33q36.3 zahrnující gen *EZH2* detekovaná u pacienta M5 aCGH analýzou (tmavě zeleně je označena oblast se ztrátou heterozygoty – LOH).

Celkově se však v rámci této kohorty nejčastěji nacházely nově objevené změny především v rámci 3. chromozómu, a to konkrétně u pacientů M7, F1, F3 a F4. Kdy u pacienta M7 s inv(3)(q21q2?6) byla zjištěna delece v oblasti 3q21.3 nezasahující gen *GATA2*, jednalo se tedy o nebalancovanou inverzi, což byla schopna detekovat z využitých analýz pouze metoda aCGH (viz Tabulka 20 níže). U pacientky F1 s der(3)t(3;5)del(3q26) byla detekována chromotripse postihující oblast 3q (viz Obrázek 19 níže). U pacientky F3 s t(2;3)(p?22;q26.2), v rámci které došlo k přestavbě genu *MECOM* detekované pomocí FISH analýzy, byla pomocí aCGH analýzy stanovena také delece oblasti 3q21.3 zahrnující geny *GATA2*, *RPN1* atd. (viz Obrázek 17A níže). U pacientky F4 pak byl potvrzený normální nález pro gen *MECOM*, ale kromě deletované oblasti 3q21 (prokázané i FISH metodou) byla detekována také distální delece 3q (přesně 3q28q29) – viz Obrázek 17B a Tabulka 20 níže.

U 2 pacientů bylo potvrzeno zmnožení lokusu 3q26.2, kdy díky aCGH analýze došlo k detailnímu vymezení amplifikovaných oblastí. U pacienta M1 se jednalo o duplikaci oblasti

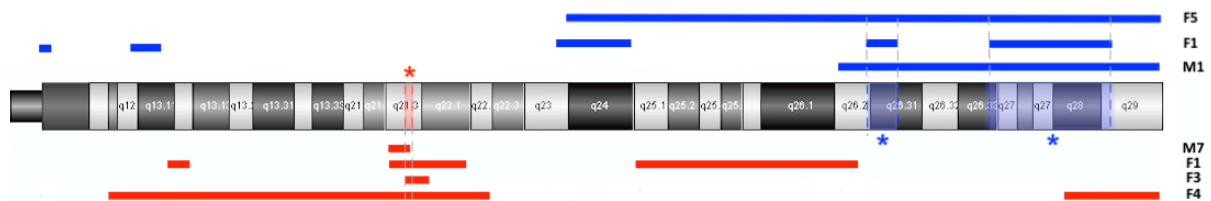
3q26.2q29. Triplikace pak byla potvrzena u pacientky F5 v oblasti 3q23q29 (znázorněno na Obrázku 17C níže).



Obrázek 17: Detekované změny v oblasti dlouhého ramene 3. chromozómu u pacientek F3 (A), F4 (B) a F5 (C) pomocí aCGH analýzy (modře jsou znázorněny amplifikované úseky, červeně deletované úseky chromozómu).

Obr. A: delece v oblasti 3q21.3q22.1 u pacientky F3, která zahrnuje i oblasti sousedící s genem *GATA2*. Obr. B: ztráty oblastí chromozómu 3 u pacientky F4, konkrétně delece v oblasti 3q12.2q22.2 (zahrnuje gen *GATA2*) a distální delece v oblasti 3q28q29. Obr. C: triplicace oblasti 3q23q29 u pacientky F5 (zahrnující lokus *MECOM*).

V rámci přesně detekovaných oblastí nebalancovaných změn 3. chromozómu jsem určila jak nejčastěji deletovanou oblast tohoto chromozómu, tak i oblast nejčastěji zasaženou amplifikací. Nejčastěji deletovaná oblast (tzv. CDR) byla stanovena do oblasti 3q21.3 a nejčastěji amplifikované byly oblasti 3q26.2q26.31 a 3q26.33q29 (viz Obrázek 18 níže).



Obrázek 18: Distribuce nebalancovaných přestaveb v rámci dlouhého ramene 3. chromozómu identifikovaných aCGH analýzou u 7 pacientů z kohorty 17 pacientů s detekovanou aberací 3. chromozómu (modře jsou znázorněny amplifikované úseky, červeně deletované úseky chromozómu).

* označena nejčastěji deletovaná oblast v rámci 3q – 3q21.3; * označena nejčastěji amplifikovaná oblast v rámci 3q – 3q26.2q26.31 a 3q26.33q29

Tabulka 20: Zpřesnění jednotlivých přestaveb 3. chromozómu po klasické cytogenetické analýze, FISH/mFISH a po aCGH analýze.

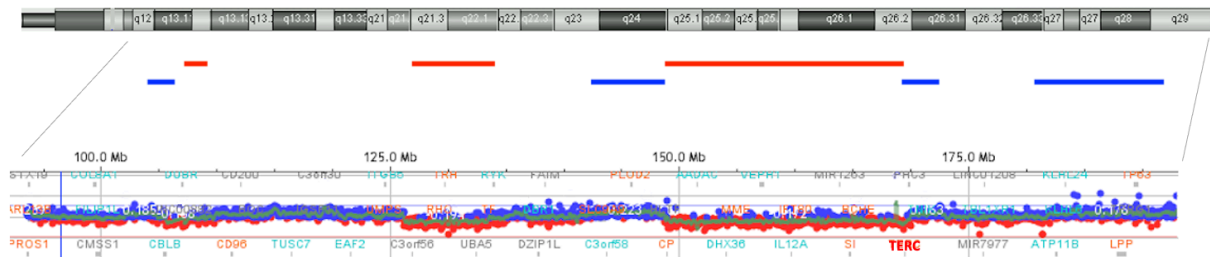
Pacient	Závěr aberace 3. chromozómu po CG analýze	Závěr aberace 3. chromozómu po FISH/mFISH analýze	Závěr aberace 3. chromozómu po aCGH analýze
M1	add(3q)	dup(3)(q?24qter)	3q26.2q29(167855072_197861598)x3
M2	normální nález	t(2;3)(p?16;q26.2)	balancovaná přestavba
M3	t(3;3)	t(3;3)(q21;q26.2)	balancovaná přestavba
M4	-3,+mar	t(3;3;5;3)(p?24;q26.2;q?23;p?24) a ztráta centromery 3	balancovaná přestavba (ztráta pouze centromery 3)
M5	der(3)	t(3;21)(q26;q?22)	balancovaná přestavba
M6	?inv(3)	inv(3)(q21q26.2)	balancovaná přestavba
M7	normální nález	inv(3)(q21q26.2)	nebalancovaná inv(3)(q21q26.2), 3q21.3(126085972_128161655)x1~2
M8	inv(3)	inv(3)(q21q26.2)	balancovaná přestavba
M9	der(3)	t(2;3)(p?21;q26)	balancovaná přestavba
F1	?der(3)	der(3)t(3;5)del(3q26)	chromotripse jejíž součástí je i delece: 3q21.3q22.1(126157530_133450462)x1 3q25.1q26.2(148990670_169981743)x1
F2	hyperdiploidní buňky	?	?
F3	add(3)(q)	t(2;3)(p?22;q26.2)del(3q21)	3q21.3q22.1(127889037_129991166)x1~2
F4	komplexní změny karyotypu	intersticiální delece zahrnující oblast 3q21*	3q12.2q22.2(100201319_135458567)x1, 3q28q29(189029360_197861598)x1
F5	jiné změny	trp(3)(q26)	3q23q29(142735762_197861598)x4
F6	t(3;3)	t(3;3)(q21;q26.2)	balancovaná přestavba
F7	t(2;3)(p?;q?)	t(2;3)(p?;q26)	balancovaná přestavba
F8	?3q-	t(3;21)(q26.2;q22)	balancovaná přestavba

*provedeno pro potvrzení výsledku z aCGH analýzy

U pacientky F2 byla metodou FISH detekována přestavba genu *MECOM* pouze na hranici hodnoty cut off použité sondy. Z důvodu nízkého zastoupení těchto patologických změn, které jsou pod detekčním limitem aCGH analýzy, nepřispěla k upřesnění přestavby 3. chromozómu ani analýza metodou aCGH.

Analýza metodou aCGH však přispěla k detailnímu určení genetické abnormality nazývané chromotripse. Chromotripse je charakteristická mnohonásobnou fragmentací celého chromozómu či pouze určitého ramene/úseku a následně dochází k přeskupování takto vzniklých fragmentů a k jejich spojení, v důsledku čehož vznikají komplexní genomové přestavby během jediné katastrofické události (Abáigar *et al.*, 2016). Tuto genetickou abnormalitu bylo možné pomocí aCGH detekovat u 2 pacientek (F1 a F4) při dodržení shodných kritérií, kterými se řídila německá odborná skupina. Nález chromotripse se tedy hodnotil od výskytu alespoň 10 zlomů (se střídavými stavy počtu kopií) na jednotlivých chromozómech (Edelmann *et al.*, 2012). Pacientka F1 měla tuto genetickou abnormalitu v rámci oblasti 3q (viz Obrázek 19 níže), kdy došlo k deleci jak v oblasti 3q21 zahrnující gen

GATA2 a *RPNI*, tak i v oblasti 3q26.2 obsahující lokus genu *MECOM*. Naproti tomu pacientka F4 měla nejspíše 6 takto přestavěných chromozómů (konkrétně 5., 8., 10., 18., 21. a X chromozóm). Další 2 pacienti měli pouze hraniční známky chromotripse s detekovanými 8 zlomy, a to u pacienta M4 na 9. chromozómu a u pacientky F2 na 20. chromozómu (viz Tabulka 21 níže). Všichni pacienti s nálezem chromotripse či s jejími hraničními známkami disponovali komplexním karyotypem a řadily se mezi pacienty s RAEB či sAML.

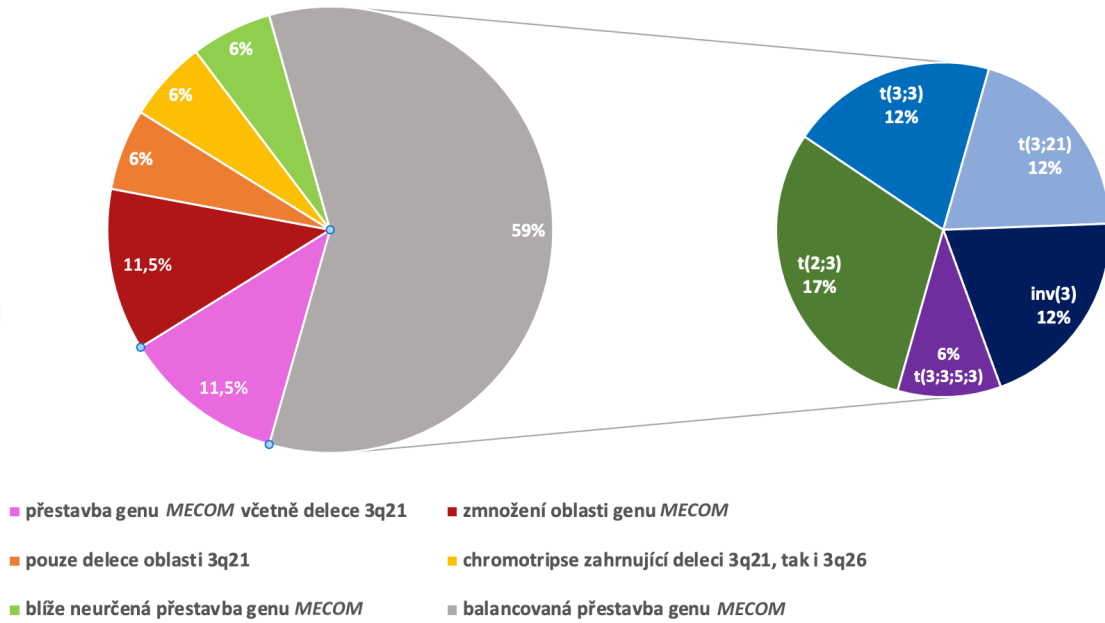


Obrázek 19: Chromotripse postihující dlouhé rameno 3. chromozómu detekovaná u pacientky F1 (modře jsou znázorněny amplifikované úseky, červeně deletované úseky chromozómu).

V závěru lze tedy konstatovat, že v kohortě 17 pacientů byla nejčastěji přítomna balancovaná přestavba genu *MECOM* (konkrétně u 10 pacientů, což odpovídá 59 %). Tyto balancované přestavby byly u pacientů M2, M9 a F7 součástí t(2;3), u pacientů M3 a F6 t(3;3), pacienti M5 a F8 měli tuto přestavbu v rámci t(3;21) a pacienti M6 a M8 jako součást inv(3). Pacient M4 měl balancovanou přestavbu genu *MECOM* spojenou s t(3;3;5;3).

Nebalancované aberace 3. chromozómu, které zahrnovaly alteraci genu *MECOM*, byly detekovány u 5 pacientů. Přestavba genu *MECOM* společně s delecí 3q21.3 byla detekována u 2 pacientů. U pacientky F3 došlo k delecí oblasti genů *GATA2* a *RPNI* v rámci nebalancované t(2;3), zatímco u pacienta M7 došlo k delecí v proximální oblasti 3q21.3 bez zasažení genu *GATA2* či *RPNI* v rámci inv(3). Zmnožení lokusu genu *MECOM* (bez jeho přestavby) bylo detekováno u 2 pacientů (M1 a F5). Chromotripse postihující oblast 3q byla detekována u jediné pacientky (F1) a součástí této genetické abnormality byla jak delece genu *MECOM*, tak i delece oblasti 3q21 zahrnující geny *GATA2* a *RPNI*.

U pacientky F4 nebyla prokázána jakákoliv aberace genu *MECOM*, ale byla prokázána delece oblasti 3q21 zahrnující geny *GATA2* a *RPNI*. U jedné jediné pacientky (F2) nebylo možné pro velice nízké procentuální zastoupení patologického klonu ani jednou ze tří různých analýz jednoznačně určit podstatu přestavby genu *MECOM*. Souhrn konkrétních detekovaných aberací 3. chromozómu v kohortě 17 pacientů je zaznačen na Obrázku 20 níže. Veškeré výsledky aCGH analýzy zapsané dle nomenklatury ISCN jsou uvedeny níže v Tabulce 21.



Obrázek 20: Zastoupení jednotlivých aberací 3. chromozómu po kompletizaci výsledků ze všech provedených analýz v kohortě 17 pacientů.

Tabulka 21: Výsledky aCGH analýzy u souboru 17 pacientů s abnormalitami 3. chromozómu zapsané dle nomenklatury ISCN.

Pacient	Závěr aCGH analýzy
M1	arr[GRCh37] 3q26.2q29(167855072_197861598)x3,6p25.3p21.2(211941_38541057)x2 hmz,14q24.1q32.33(69459229_107069322)x2 hmz,15q21.3(54532985_58121035)x2 hmz,??2q12.3(33543104_35681893)x2 hmz
M2	arr[GRCh37] (1-22)x2,(X,Y)x1 normal male
M3	arr[GRCh37] (1-22)x2,(X,Y)x1 normal male
M4	arr[GRCh37] ???1p31.3p31.1(68144337_73558512)x2 hmz,???2q32.3q33.1(197122309_201453751)x2 hmz,5p13.2p12(37729561_44012472)x2 hmz,5q13.3q21.1(76157814_100808212)x1~2,(7)x1,8q21.12q21.13(79637123_82594629)x1~2,9p24.3p24.1(1419154_4927122)x1~2,9p24.1p22.1(6359593_19497605)x2~3,9q21.11q21.13(71145933_79032269)x2~3,9q21.13q34.3(79103128_140396494)x1~2,13q32.1q32.3(97493427_100527355)x2 hmz,18q12.1q12.2(32132169_35993290)x2 hmz
M5	arr[GRCh37] 7q31.33q36.3(126425745_159030335)x2 hmz,9p23(10924493_12883188)x2 hmz,10q23.33q24.2(96466270_101702473)x2 hmz,17q11.2(28072523_30178332)x1
M6	arr[GRCh37] ?4q22.1q22.3(89287096_95916279)x2 hmz,(7)x1,12q15q21.2(71054305_77928415)x2 hmz
M7	arr[GRCh37] 3q21.3(126085972_128161655)x1~2,12q14.2q14.3(63259927_67675361)x2 hmz,18q12.3(38465951_40771509)x2 hmz
M8	arr[GRCh37] 7p12.2p12.1(50133411_51207236)x1,10q21.1(56624265_60050453)x2 hmz,10q23.31q23.33(92435851_95909662)x2 hmz,12p12.3(15889155_19363948)x2 hmz,13q14.3q21.1(54448874_57835021)x2 hmz,18q12.1(25380833_27252939)x2 hmz
M9	arr[GRCh37] 5q23.3q33.3(129119297_158539799)x1
F1	arr[GRCh37] 3q12.3q13.11(102127558_104683188)x2~3,3q13.11q13.12(105634068_107516498)x1,3q13.13q21.3(109831672_126134890)x2~3,3q21.3q22.1(126157530_133450462)x1,3q23q24(142015530_148698201)x2~3,3q25.1q26.2(148990670_169981743)x1,3q26.2q26.31(170006130_172950313)x2~3,3q26.33q29(181811828_193333522)x3,5q11.1q35.3(49478288_180691052)x1,7q11.23q36.3(73934483_158507381)x1~2,12p13.31p12.1(8462598_22450520)x1,17q11.2(29161912_30451089)x1,17q21.31q25.3(43790210_81039514)x1,18q12.1q23(25698937_77987606)x1,21q21.1(16803693_20834474)x1
F2	arr[GRCh37] ?1p31.1(72522971_75248122)x2 hmz,5q23.2q35.3(123798318_180696806)x1,7p22.2p22.1(3580633_5721899)x1,7q22.1q36.3(99696567_159122455)x1,?8q23.3(113923305_116855813)x2 hmz,17p13.1(6656123_7590367)x1,?19q13.2q13.31(43242795_43783380)x2~3,20p13(102422_5055057)x1,20p12.1p11.23(12237001_20373450)x1,20p11.21(22918570_24965512)x1,20q11.21q13.33(31861717_59901663)x1,22q13.2q13.33(42061001_51224252)x1
F3	arr[GRCh37] 3q21.3q22.1(127889037_129991166)x1~2,4q34.3q35.1(182143931_185644417)x2 hmz
F4	arr[GRCh37] 1p32.1p31.3(60785087_62518588)x1~2,1q31.2q32.1(193655428_201916432)x2 hmz,3q12.2q22.2(100201319_135458567)x1,3q28q29(189029360_197861598)x1,5p15.33p15.32(3104493_4894856)x1,5p15.32p15.2(6112711_11072670)x1,5p15.2p14.3(11429311_18822080)x1,5p14.3(19415288_21931291)x1,5p14.1(27723204_28163810)x1,5p12(44847747_45184100)x1,5q11.1q14.3(50141309_85783866)x1,5q14.35q33.3(88141282_158016111)x1,8p23.3p22(191530_15912988)x1,8p23.1(6942281_8079920)x1~2,8p21.2p11.1(27249614_43738803)x3,8q11.1q24.3(46942956_146280020)x3,8q11.21q11.22(51839636_52571007)x1~2,8q21.13q21.2(81892791_86035812)x1~2,?9p23(10632165_12098000)x2 hmz,?9q22.33q31.1(102227922_102867746)x1,10p15.3p12.31(102539_20126864)x1,10p11.23p11.22(29867487_32780911)x1,10p11.22(34003973_34287073)x1,10q11.22q21.1(49201519_54048387)x1,?10q21.1(58298520_60049524)x2 hmz,14q11.2(19376762_24578013)x3,14q12(24661789_25952122)x1,14q24.2q24.3(71023250_75102191)x1,(16)x1~2,17q11.2q12(28732502_33133961)x1,17q21.31q21.33(42931334_48815633)x1,18p11.32p11.31(155478_5383568)x1,18p11.31p11.23(6785183_8624603)x1,18q21.2q21.31(52224392_55543788)x1,18q22.2(68423089_68562757)x1,18q22.3(69611920_71267865)x1,18q23(74962224_75127838)x1,18q23(75621336_76014434)x3,18q23(76060710_76478606)x1,21q11.2(14420615_15326024)x3,21q11.2q21.1(15412676_22232971)x4,21q21.3(27229216_28565116)x1,21q21.3(29688553_29919420)x1,21q21.3q22.11(29943583_32812809)x4,21q22.11(33515107_34466241)x1,21q22.12q22.3(36259789_48084156)x4,(22)x3,Xp22.33p21.1(60701_36165963)x3,Xp21.1p11.1(36204693_58543823)x1,Xq11.2q12(64263556_65242748)x3,Xq21.2(84794493_85986531)x3,Xq21.2q21.31(86021551_87498926)x1,Xq21.31q25(90164479_121718801)x1,Xq25(121758167_125002765)x3,Xq25q27.3(125153721_146639111)x1
F5	arr[GRCh37] 1p36.33p35.2(846680_31923053)x1,1p35.2p31.3(31966338_64866154)x3,3q23q29(142735762_197861598)x4,5q31.2q35.3(136880781_180696806)x1,?10q21.1(57372091_60681829)x2 hmz,11q24.3q25(128420685_134816320)x2~3,17p13.3(1693_963751)x1,17q21.33q25.3(48150569_81044553)x3
F6	arr[GRCh37] (7)x1,10p14(7961064_10054546)x2 hmz
F7	arr[GRCh37] 14q23.1q23.2(59421149_62495044)x2 hmz
F8	arr[GRCh37] (1-22,X)x2 normal female

5.5 Kazuistiky

Pacient M4

Tato kazuistika popisuje případ pacienta M4, kterému byl ve 43 letech (v roce 2010) diagnostikován folikulární lymfom G2 s CD20+ markery. Během následujících 7 let pacient podstoupil léčbu chemoterapeutiky v různých kombinačních režimech. Během tohoto období došlo 3x k relapsu onemocnění (2012, 2014 a 2016). Po prvním relapsu pacient podstoupil po přípravném režimu v roce 2013 autologní transplantaci periferních kmenových buněk, navzdory které rovněž došlo po roce k relapsu onemocnění. V roce 2017 před zvažovanou alogenní transplantací krvetvorných buněk byl pacient vyšetřen klasickou cytogenetickou analýzou s normálním nálezem karyotypu ve 30 hodnocených mitózách. Zvažovaná alogenní transplantace však byla pro zdravotní komplikace kontraindikována a po dohodě na indikačním semináři Hemato-onkologické kliniky zahájil pacient radioterapii, která vedla k remisi tohoto onemocnění. Následná observace probíhala ve spádové nemocnici. V květnu roku 2019 se u pacienta (v 52 letech) objevuje cytopenie v krevním obraze, dle dalších vyšetření provedených ve spádové nemocnici uzavřeno jako sekundární MDS-EB1 s cytogenetickým nálezem komplexního karyotypu (zařazen dle IPSS-R do vysoce rizikové skupiny).

Pacient následně v režii Hemato-onkologické kliniky FNOL podstoupil epigenetickou léčbu 4 cykly Vidazy a opakovanou hemosubstituci s medikací G-CSF. Při kontrolním vyšetření byl detekován klasickou cytogenetickou analýzou abnormální karyotyp spojený s komplexními přestavbami, a to ve 27 mitózách. Normální nález byl detekován ve 2 mitózách. Cytogeneticky určený karyotyp:

1. klon: 44,XY,-3,?der(5),-7,-9,+mar[27]
2. klon: 46,XY[2]

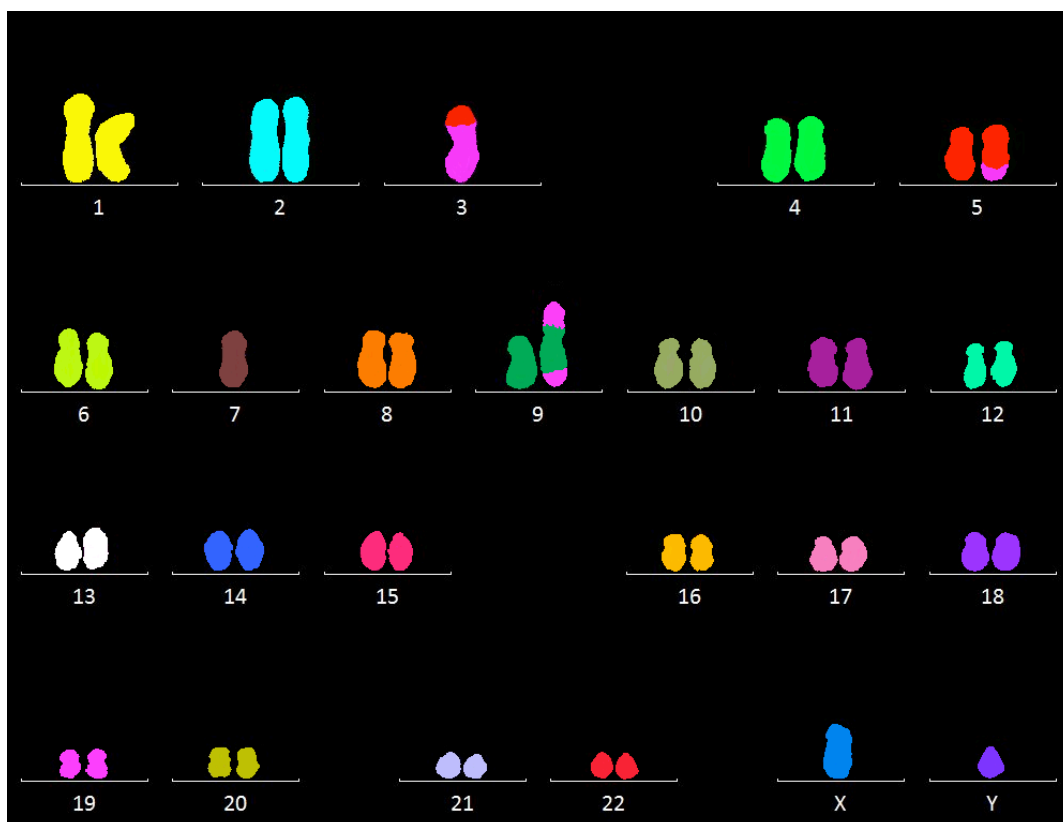
Klasická cytogenetická analýza byla z důvodu komplexních přestaveb doplněna o FISH a mFISH analýzu. Pomocí FISH metody za využití všech cílených sond, které jsou součástí MDS panelu, byla detekována:

- monozomie chromozómu 7 v 83 % hodnocených buněk
- monozomie 3 v 78 % hodnocených buněk
- přestavba genu *MECOM* v 82 % hodnocených buněk

S využitím i mFISH analýzy (viz Obrázek 21) byl stanoven závěrečný karyotyp:

44,XY,-3,t(3;3;5;3)(p?24;q?26;q?23;p?24),-7,der(9)t(3;9)(p?21;q?34)t(3;9)(q?13;p?22)[15]/46,XY[5]

Pacient byl na základě těchto výsledků značící progresi onemocnění indikován k ukončení epigenetické léčby a dále realizována pouze substituční a paliativní péče. V dubnu roku 2020 pacient zemřel.



Obrázek 21: Výsledný karyotyp pacienta M4 stanovený mFISH analýzou (převzato z Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL).

Retrospektivně byla pro podrobnější výsledky nebalancovaných přestaveb využita metoda aCGH, která u tohoto pacienta prokázala přídavné chromozómové aberace (viz Tabulka 21 výše a Obrázek 22 níže):

- delece 5q13.3q21.1
- delece 8q21.12q21.13
- hraniční známky chromotripse na 9. chromozómu.

a) 5. chromozóm



b) 8. chromozóm



c) 9. chromozóm



Obrázek 22: Výstup z programu Agilent CytoGenomics zobrazující profil jednotlivých chromozómů s přídavnou či upřesňující aberací stanovených pomocí aCGH analýzy – pacient M4.

Obr. a) 5. chromozóm – delece 5q13.3q21.1. Obr. b) 8. chromozóm – delece 8q21.12q21.13. Obr. c) hraniční známky chromotripse na 9. chromozómu.

Pacientka F1

Tato kazuistika popisuje případ pacientky se systémovou sklerodermií s Raynaudovým syndromem dlouhodobě léčenou cyklofosfamidem. V říjnu roku 2015 v 71 letech při rutinním předoperačním vyšetření krevního obrazu byla nalezena trombocytopenie, která byla dále došetřována na Hematologicko-transfúzním oddělení v Přerově, odkud pro nález periferní pancytopenie s vyplavením blastů do PK odeslána na Hemato-onkologickou kliniku FNOL. Zde byla stanovena diagnóza suspektního sekundárního MDS-EB2 (dle IPSS-R pacientka zařazena do vysoce rizikové skupiny).

Již klasickou cytogenetickou analýzou byl prokázán abnormální karyotyp s komplexními přestavbami:

1. klon: 43-44,XX,?der(3),-5,-7,-21,+1-2mar[cp9]
2. klon: 46,XX[30]

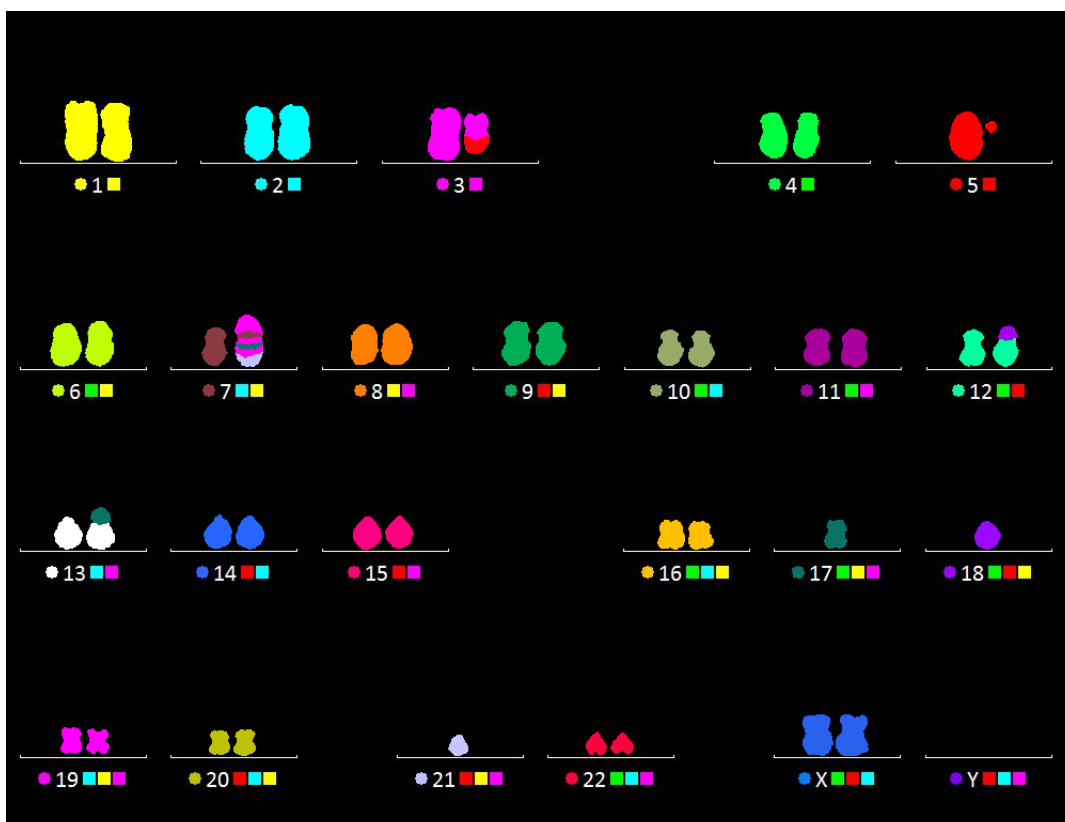
Klasická cytogenetická analýza byla doplněna o FISH a mFISH analýzu z důvodu komplexních přestaveb. Pomocí FISH metody za využití všech cílených sond, které jsou součástí MDS panelu byly stanoveny tyto změny:

- delece 7q22/7q31 v 59 % hodnocených buněk
- delece 5q31/5q33 v 58 % hodnocených buněk
- delece oblasti 3q26 v 59 % hodnocených buněk

Pomocí WCP a centromerických sond byly stanoveny dicentrické chromozómy – dic(7;21), dic(12;18) a dic(13;17). Na základě výsledků cytogenetiky, FISH a mFISH analýzy (viz Obrázek 23 níže) byl stanoven závěrečný karyotyp:

43,XX,der(3)t(3;5)(q?25;p?11),del(5)(q?11q?ter),dic(7;21)(3p?ter--3p?12::7p?11--7q?21::3q?13--3q?23::17?q?--17?q?::3q?24--3q?25::21p?11--21q?ter),dic(12;18)(p11;p11),dic(13;17)(p11;?q)
Byly prokázány i další neklonální změny, v každé mitóze jiné.

Vzhledem k prokázaným chromozómovým aberacím byla pacientka indikována k epigenetické léčbě (Vidaza), která proběhla v 6 cyklech. Následně v červnu 2016 však byla léčba ukončena na základě celkového stavu pacientky, nemožnosti kauzálně ovlivnit základní onemocnění a progresi onemocnění do sekundární AML, pacientka tak byla indikována k paliativní terapii. V červenci 2016 pacientka umírá.

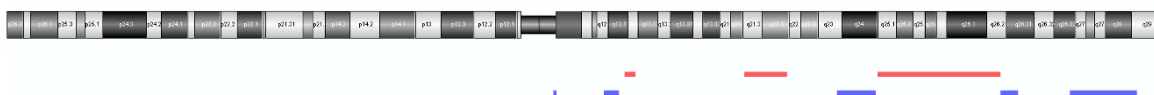


Obrázek 23: Výsledný karyotyp pacientky F1 stanovený mFISH analýzou (převzato z Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky HOK FNOL).

Retrospektivně byla pro podrobnější výsledky nebalancovaných přestaveb využita metoda aCGH, která u této pacientky prokázala přídatné chromozómové aberace (viz Tabulka 21 výše a Obrázek 24 níže):

- chromotripse postihující 3q jejíž součástí je i delece 3q21.3q22.1 (zahrnuje oblast genu *GATA2*) a 3q25.1q26.2 zahrnující gen *MECOM*
- zpřesnění deletované oblasti na 5q (5q11.1q35.3 – zahrnuje i gen *NPM1*)
- zpřesnění deletované oblasti na 7q (7q11.23q36.3 – zahrnuje i gen *EZH2*)
- delece oblasti 12p13.31p12.1 (zahrnuje oblast genu *ETV6*)
- delece 17q v oblastech 17q11.2 (zahrnuje gen *NF1*) a 17q21.31q25.3
- delece oblasti 18q12.1q23 (oblast *BCL2*)
- delece oblasti 21q21.1

a) 3. chromozóm



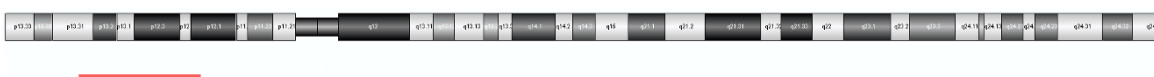
b) 5. chromozóm



c) 7. chromozóm



d) 12. chromozóm



e) 17. chromozóm



f) 18. chromozóm



g) 21. chromozóm



Obrázek 24: Výstup z programu Agilent CytoGenomics zobrazující profil jednotlivých chromozómů s přidatnou či upřesňující aberací stanovených pomocí aCGH analýzy – pacientka F1.

Obr. a) chromotripse postihující oblast 3q. Obr. b) 5. chromozóm – delece 5q11.1q35.3. Obr. c) 7. chromozóm – delece 7q11.23q36.3. Obr. d) 12. chromozóm – delece 12p13.31p12.1. Obr. e) 17. chromozóm – delece 17q11.2 a 17q21.31q25.3. Obr. f) 18. chromozóm – delece 18q12.1q23. Obr. g) 21. chromozóm – delece 21q21.1.

6 Diskuze

Myelodysplastický syndrom (prvně klasifikován roku 1982), co by jedna z hematologických malignit, je charakteristický klonální poruchou medulární krvetvorby a velmi heterogenními klinickými projevy souvisejícími i s různou prognózou pacientů. Zároveň se jedná o jednu z nejčastějších chorob s vyšší incidencí u starších lidí (stárnutí populace má za důsledek nárůst prevalence) (Bennett *et al.*, 1982; Neuwirtová, 2005; Červinek, 2015). Medián věku při diagnóze MDS se pohybuje kolem 65–70 let (Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012; Haferlach *et al.*, 2014; Schanz *et al.*, 2018). Výsledky mé práce korelovaly s publikovanými daty, jelikož jsem stanovila medián věku při diagnóze MDS na 66 let.

Pacienti s MDS vykazují velkou heterogenitu i co se morfologických a cytogenetických nálezů týče, což velmi znesnadňuje diagnostiku tohoto onemocnění. Prvotní klasifikační a prognostické systémy pacientů s MDS byly založeny na výsledcích pouze morfologických, cytochemických a klasických cytogenetických analýz kostní dřeně a periferní krve. Zatímco novější systémy (IPSS a WHO) jsou díky rozvoji moderních metod molekulární cytogenetiky (s tím související určité bližší poznání molekulární podstaty MDS) založeny již na dalších diagnostických metodách (Malcovati *et Nimer*, 2008; Čermák, 2019).

Zásadou cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod je tak možno detekovat unikátní genetické změny u jednotlivých pacientů, což je využíváno při diagnostice, stratifikaci pacientů (dle WHO klasifikace) a jejich léčbě. Hlavní výpovědní hodnotu však cytogenetické nálezy mají v prognostické stratifikaci pacientů (Malcovati *et Nimer*, 2008; Červinek, 2015; Čermák, 2019).

Mezi tyto další diagnostické metody lze zařadit i metody, které jsou dnes při diagnostice MDS pouze doporučeny – fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a komparativní genomová hybridizace na čipu (aCGH) (Malcovati *et al.* 2013; Čermák *et al.*, 2020). Hlavní výhodou FISH metody je průkaz chromozómových aberací i na interfázních jádrech, čímž se vyřeší problém s nevyhovujícími mitózami. Tato citlivější metoda je schopna zachytit i menší procento patologických buněk, ale její nevýhodou je cílenost této metody, která umožňuje zachytit pouze aberace, na které přímo cílíme užitými sondami. Tento problém řeší např. metoda aCGH, která během 1 analýzy hodnotí velký počet specifických DNA sekvencí. Detekce změn aCGH metodou je však opět limitována, a to pouze na nebalancované aberace a také je nutné větší zastoupení patologických buněk ve vzorku (Rigolin *et al.*, 2001; Kuglík, 2013; Schoumans *et al.*, 2016).

Nejčastějšími nebalancovaně přestavěnými chromozómy u pacientů s MDS se ukazují být chromozómy 5., 7., 8. a 20. (Giagounidis *et Haase*, 2013). V rámci prospektivního vyšetření, které jsem provedla na 22 pacientech s MDS, jsem dosáhla shodných výsledků, ovšem stejně časté byly i aberace chromozómu 11 spojené s alterací genu *MLL*.

K nejčastěji balancovaně přestavěným chromozómům patří 3. chromozóm, kdy jsou přestavby tohoto chromozómu velmi často spojeny s alterací komplexního lokusu genu *MECOM* (zejména jeho genová část *EVII*), tyto změny se nachází nejen u pacientů s MDS (Giagounidis *et Haase*, 2013), u kterých se vyskytují poměrně vzácně. Tyto přestavby jsou obecně spojeny se špatnou prognózou pacienta – medián celkového přežití se pohybuje kolem 16 měsíců od diagnózy (Schanz *et al.*, 2012). V mé práci jsem potvrdila kratší celkové přežití pacientů s detekovanou aberací 3. chromozómu, kdy byla tato hodnota stanovena na pouhých 13 měsíců (rozsah od 1 do 169 měsíců), což se blížilo výsledku studie publikované roku 2020, kdy celkové přežití kohorty 411 pacientů s MDS a aberací 3. chromozómu bylo stanoveno na 12 měsíců (Sallman *et al.*, 2020).

Prevalenci výskytu aberací 3. chromozómu u pacientů s MDS je dosud velmi obtížné stanovit, a to nejen z důvodu nízkého výskytu této aberace v lidské populaci. Malý počet studií zabývající se touto problematikou, kdy se ještě většina z nich zaměřuje pouze na aberace $inv(3)$ a $t(3;3)$ tomu nijak nepomáhá (De Braekeleer *et al.*, 2015). Např. v jedné z publikovaných studií 129 pacientů s MDS a aberací 3. chromozómu byla frekvence výskytu této aberace stanovena na 6–7 % (Sallman *et al.*, 2015). V rámci mého experimentu jsem tuto frekvenci stanovila na 5 %. Výskyt $inv(3)$ a $t(3;3)$ u pacientů s MDS se dle studie z roku 2014 pohybuje pod 1 % a dle studie z roku 2010 u pacientů s AML mezi 1–2 % (Lugthart *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2014). Mé výsledky korelují s publikovanými daty, jelikož jsem stanovila tyto aberace u 1,5 % pacientů s MDS/sAML (5 pacientů z kohorty 324).

Ukazuje se však, že publikované prevalence jsou dle mnohých odborníků podhodnoceny, jelikož se aberace 3. chromozómu řadí ke kryptickým aberacím a nejsou tedy vždy klasickou cytogenetikou diagnostikovány (Baldazzi *et al.*, 2016), což bylo patrné i na výsledcích mé práce, kdy byl u 2 pacientů (M2 a M7) z kohorty 17 pacientů detekován normální karyotyp a až následná FISH analýza (provedena z důvodu nedostatečného množství hodnocených mitóz) prokázala jedinou aberaci, a to právě přestavbu v oblasti 3q26.

Abnormality dlouhého ramene 3. chromozómu jsou diagnostikovány převážně u mladších pacientů (< 60 let), což bylo potvrzeno několika studiemi (Poppe *et al.*, 2006; Lugthart *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2014; Baldazzi *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2019). Ve své práci

jsem dosáhla shodných výsledků, kdy jsem stanovila medián věku při diagnóze pacientů s aberovaným 3. chromozómem na 56 let. Rozdíl zastoupení pohlaví mezi pacienty s aberacemi 3. chromozómu nebyl nijak signifikantní (9 mužů a 8 žen). Nelze tedy vyvozovat, že se aberace vyskytuje u jednoho z pohlaví čteněji, což se shoduje i s publikovanými daty (Poppe *et al.*, 2006; Lugthart *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2019).

U mnou hodnocené kohorty 17 pacientů byl klasickou cytogenetickou analýzou detekován ve 12 % normální karyotyp a v 88 % abnormální karyotyp, který byl ve 29 % charakteristický komplexními přestavbami. Při porovnání s publikovanými daty lze říci, že se mé výsledky nijak zvlášť neodlišují, studie z roku 2014 uvádí u 103 hodnocených pacientů s *inv(3)* nebo *t(3;3)* zastoupení komplexního karyotypu u 25 % a nekomplexního u 75 % (Rogers *et al.*, 2014). K podobným výsledkům vedla i rozsáhlá studie francouzsko-německé skupiny, která uvádí nález komplexního karyotypu u 27 % pacientů z celkové kohorty 1038 pacientů (De Braekeleer *et al.*, 2015). Aberace 3. chromozómu pak byla v rámci této práce klasickou cytogenetickou metodou nalezena u 93 % pacientů s detekovaným abnormálním karyotypem.

Pomocí cílené FISH analýzy byla u všech 17 pacientů v rámci této práce detekována abnormalita 3. chromozómu. Izolovaně se tato aberace vyskytovala u 47 % pacientů, 24 % pacientů vykazovalo přítomnost ještě další aberace, z nichž nejčastěji byla zastoupena monozomie 7. chromozómu. Komplexní karyotyp byl přítomný u 29 % pacientů. Dosud publikované studie však prokazují nižší zastoupení izolovaných aberací 3. chromozómu, kdy např. studie z roku 2020 udává hodnoty výskytu izolovaných aberací 3. chromozómu pouze u 15 % hodnocených pacientů s MDS (Sallman *et al.*, 2020), v další studii bylo zastoupení izolovaných přestaveb 3. chromozómu u pacientů s MDS o něco vyšší (28 %), 1 přídatnou aberaci v této studii pak mělo 44 % pacientů (De Braekeleer *et al.*, 2015). Nejbližší k mnou stanoveným výsledkům jsou ty, které byly publikovány roku 2014, kdy byla izolovaná aberace 3q detekována u 44 % hodnocených pacientů. Tato studie však byla zaměřená pouze na aberace *inv(3)* a *t(3;3)* (Rogers *et al.*, 2014). Monozomie 7 jako nejčastější přídatná aberace je deklarována v mnoha studiích (Lugthart *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2014; De Braekeleer *et al.*, 2015; Baldazzi *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2019).

V rámci komplexního karyotypu s aberací 3q byla nejčastější přídatnou změnou delece 5q31 (v 80 %) a stejně častou byla aberace 7. chromozómu (častěji monozomie než delece 7q). Souběh těchto 2 aberací u pacientů s aberovaným 3. chromozómem a komplexními přestavbami byl přítomný u 60 % těchto pacientů (3 z 5 pacientů). Výsledky již zmíněné studie francouzsko-

německé skupiny z roku 2015 však ukazují rozlišné hodnoty, přídatná aberace 7. chromozómu v rámci komplexních karyotypů byla přítomna u 34 %, zatímco aberace 5. chromozómu pouze u 3 % těchto pacientů. Souběh obou těchto aberací byl pak prokázán jen u malého zlomku pacientů. V této studii však byli zahrnuti i pacienti s CML (Ph+), což může hrát určitou roli (De Braekeleer *et al.*, 2015).

Z aberací postihující 3. chromozóm a související s alterací genu *MECOM* byla nejčastěji zastoupena translokace, která se vyskytovala u 53 % pacientů, druhou nejčastější pak byla inverze v oblasti dlouhého ramene 3. chromozómu vyskytující se u 17 % pacientů. Shodných výsledků dosáhla i americká studie publikována roku 2019, kde byly v 50 % zastoupeny translokace alterující gen *MECOM*, nicméně zastoupení inverzí alterující *MECOM* bylo vyšší – u 40 % pacientů (Tang *et al.*, 2019).

V rámci mé práce byl přesný typ aberace stanoven pouze u 16 pacientů (tj. u 94 %), kdy se mezi nejčastější translokací řadila t(2;3) přítomná u 23 % pacientů. Další detekovanou translokací byla t(3;3) u 12 % pacientů a ve stejném procentu pacientů i t(3;21). Všechny tyto detekované přestavby byly již dříve publikovány, akorát v jiném procentuálním zastoupení, často zmiňovaná t(3;12) v této práci nebyla detekována (Lugthart *et al.*, 2010; De Braekeleer *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2019). Nově detekovanou změnou byla komplexní translokace t(3;3;5;3)(p?24;q26.2;q2?3;p?24).

Mezi další detekované změny patřila delece 3q (12 %) a zmnožení oblasti 3q26 (12 %), tyto změny však souvisely pouze se ztrátou či ziskem oblasti genu *MECOM*, ale ne s jeho přestavbou. Význam FISH analýzy byl patrný u všech pacientů, kdy tato analýza pomohla nejen zpřesnit přestavby detekované G-pruhováním, ale také odhalit kryptické změny 3. chromozómu, které se klasickou cytogenetickou analýzou nepodařilo zachytit. Abnormality oblasti genu *MECOM* byly přítomné u 94 % hodnocených pacientů s aberací 3. chromozómu, což je vyšší procento, než bylo stanoveno ve studii z roku 2016, která udává přítomnost abnormalit genu *MECOM* jen u 55 % pacientů s 3q aberacemi (Baldazzi *et al.*, 2016). Přestavba genu *MECOM* pak byla nakonec detekována u 76 % hodnocených pacientů.

Komparativní genomová hybridizace na čipu byla v rámci 3q abnormalit přínosem u 35 % pacientů. Toto nižší procento výtěžku je zapříčiněno hlavně tím, že podstatná část abnormalit 3. chromozómu je spojena s balancovanými aberacemi, které tato metoda neumí detekovat, čehož dosáhli i odborníci ve studii z roku 2019 (Tang *et al.*, 2019) a dalších (Pope *et al.*, 2006; Baldazzi *et al.*, 2016). U nebalancovaných přestaveb však získáme přesné informace o deletovaných či amplifikovaných oblastech, čehož se dá využít při stanovování

nejčastěji aberovaných oblastí určitého chromozómu. Za využití této metody jsem stanovila nejčastěji deletovanou oblast 5. chromozómu u pacientů s aberovaným 3. chromozómem, jako oblast 5q31.2q33.3. Tato mnou stanovená CDR oblast zaujímá obě CDR oblasti, které byly zahrnuty v práci publikované roku 2011. Oblast 5q32q33 je spojována hlavně s tzv. 5q- syndromem (zahrnuje geny *RPS14* a *miR-145*) a oblast 5q31.2 spojována s t-MDS/AML a nepříznivou prognózou (zahrnuje geny *CTNNA1* a *EGR1*) (Ebert, 2011). CDR oblast stanovená českou odbornou skupinou v kohortě 157 pacientů s komplexním karyotypem zaujímala oblast 5q31.1q32 (Zemanova *et al.*, 2014). V porovnání s mými výsledky lze říci, že u pacientů s aberovaným chromozómem 3 a současně delecí 5q, jsou tyto delece dlouhého ramene chromozómu 5 detekovány distálněji oproti oblastem deletovaným na dlouhém rameni 5. chromozómu detekovaných obecně u pacientů s delecí 5q a komplexním karyotypem.

Některé studie ukazují na zvýšený výskyt určitých aberovaných genů, které jsou velmi často jinými metodami nedetekovatelné. Přesně u 53 % pacientů byly detekovány nové změny, které předešlé metody neodhalily. Nejčastější kryptickou aberací byla delece v oblasti 17q11.2 zahrnující gen *NFI* (gen Ras signální dráhy), která se vyskytovala u 18 % pacientů, jiné geny Ras signální dráhy (*NRAS/KRAS*) nebyly v rámci této práce detekovány. Ostatní kryptické aberace neměly signifikantní zastoupení. Studie z roku 2011, ve které byla analyzována kohorta 35 pacientů s prokázanou MDS metodou aCGH, odhalila u 80 % pacientů nové aberace, které nebyly detekovatelné klasickou cytogenetickou metodou ani FISH analýzou, kdy se mezi nejčastější kryptické delece řadily delece *NFI*, *RUNX1*, *RASSF1*, *CCND1*, *TET2* a další (Kolquist *et al.*, 2011).

U jedné pacientky (v 6 %) byla aCGH metodou detekována chromotripse postihující 3. chromozóm. Chromotripse postihující 3. chromozóm u pacientů s MDS byla již v roce 2018 popsána skupinou docentky Zuzany Zemanové a obecně jsou tito pacienti řazení do velmi vysoce rizikové skupiny (Zemanova *et al.*, 2018).

Metoda aCGH se jeví jako účinný nástroj při identifikaci chromozomálních aberací, které nejsou detekovány standardní cytogenetickou metodou. Klasická cytogenetická analýza v kombinaci s aCGH by mohla v počáteční diagnostice pacientů s MDS poskytnout klinicky užitečné informace, které nelze získat tradičními metodami používanými v současné době (Malcovati *et al.*, 2013). Mohla by tak přispět k pochopení celého spektra aberací, které doprovází jednotlivé pacienty a pomoci při vývoji cílenějších léčebných postupů. Např. při detekci mutací signální dráhy RAS by mohlo být využito léčivo interferující právě s touto signální dráhou, jelikož se ukazuje, že mutace v této signální dráze jsou přítomné

až u 98 % pacientů s $inv(3)$ a $t(3;3)$ (Gröschel *et al.*, 2015). Dalším léčebným přístupem by mohly být cílené terapie, které blokují funkci genu *EVII* (De Braekeleer *et al.*, 2015).

Na závěr lze tedy shrnout, že pacienti s abnormalitami genu *MECOM* jsou spojováni s krátkým přežitím, mladším věkem v době stanovení diagnózy a minimální odpovědí na dostupnou léčbu. Tyto aberace jsou detekovány v rámci různých diagnóz – MDS, AML či CML. Často jsou doprovázeny monozomií 7. chromozómu nebo jsou součástí komplexního karyotypu. Dnes je popisováno více než 100 přestaveb postihujících oblast 3q26, z toho je u 34 z nich prokázáno zapojení genu *MECOM* (De Braekeleer *et al.*, 2015). Přesto je kolem aberací 3. chromozómu nadále nespočet otázek a stále se objevují nové aberované oblasti. Detekce nových mutací asociovaných s chorobou a sledování jejich dopadu na prognózu pacientů a hledání vhodných individuálních léčebných přístupů je tak nadále velmi důležitým cílem i v dnešní době (Čermák, 2019).

7 Závěr

Myelodysplastický syndrom se řadí mezi hematologické malignity s vyšší incidencí u starších lidí a je charakteristický klonální poruchou krvetvorby, periferní cytopenií, neefektivní krvetvorbou myeloidní řady a velmi odlišnou prognózou. Heterogenita tohoto onemocnění se nevztahuje pouze na klinické či morfologické vlastnosti, ale i na ty cytogenetické, což velmi znesnadňuje diagnostiku tohoto onemocnění.

Díky rozvoji moderních metod cytogenetiky a molekulární genetiky je možno detekovat unikátní genetické změny u každého jednotlivého pacienta, což je využíváno při diagnostice, stratifikaci pacientů a volbě jejich léčby.

Jednou z takto sledovaných změn (nejen u pacientů s MDS) je aberace 3. chromozómu, nejčastěji zastoupena jako $inv(3)$ či $t(3;3)$. V rámci těchto přestaveb dochází často k alteracím komplexního genu *MECOM* (zejména pak jeho genové části *EVII*). Tyto alterace se objevují u pacientů s MDS poměrně vzácně, ale s o to horší prognózou pro pacienta se pojí. Medián celkového přežití se pohybuje kolem 16 měsíců od diagnózy (Schanz *et al.*, 2012). Zdá se však, že frekvence výskytu těchto alterací je podhodnocena, jelikož se řadí ke kryptickým aberacím a nemusí být tedy vždy detekovány.

V rámci svého komplexnějšího diagnostického přístupu (za využití klasické cytogenetické analýzy, FISH/mFISH a aCGH analýzy) k pacientům s aberovaným 3. chromozómem jsem byla schopna detailněji charakterizovat jednotlivé aberace postihující tento chromozóm. Aberace tohoto typu se vyskytovaly u 5 % pacientů s MDS diagnostikovaných během 20 let v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky (HOK) Fakultní nemocnice Olomouc. Nejčastějším typem aberace 3. chromozómu byly translokace a inverze, které byly vždy spojeny s přestavbou genu *MECOM*. Nejčastějšími translokačními partnery byly stanoveny chromozómy 2, 3 a 21.

Přínos aCGH analýzy v rámci abnormalit 3. chromozómu byl patrný u 35 % pacientů, kdy tato analýza zejména zpřesnila deletované/amplifikované oblasti v rámci nebalancovaných přestaveb 3. chromozómu. U jedné pacientky však byla pomocí této analýzy detekována i chromotripse postihující 3. chromozóm, kterou nebylo možné detekovat žádnou jinou užitou analýzou.

Každá ze tří výše zmíněných diagnostických metod má své limity a jak se ukazuje, není vždy klasická cytogenetická analýza dostačující. Vždy tak záleží na individuálním přístupu k pacientovi, a to nejen v rámci diagnostiky. V neposlední řadě je potřeba zvážit jak výtěžek jednotlivých diagnostických metod, tak i jejich finanční stránku.

8 Literatura

Abáigar M., Robledo C., Benito R., Ramos F., Díez-Campelo M., Herмосín L., Sánchez-Del-Real J., Alonso J. M., Cuello R., Megido M., Rodríguez J. N., Martín-Núñez G., Aguilar C., Vargas M., Martín A. A., García J. L., Kohlmann A., Del Cañizo M. C. *et* Hernández-Rivas J. M. (2016): Chromothripsis Is a Recurrent Genomic Abnormality in High-Risk Myelodysplastic Syndromes. *PLoS One* 11(10): e0164370.

Agilent Technologies, Inc. Užívateľský manuál revidovaný 2019 [online] [navštíveno 2.1.2021]. Dostupné z <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/GEN-MAN-G4410-90010.pdf>.

Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M. J., Le Beau M. M., Bloomfield C. D., Cazzola M. *et* Vardiman J. W. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127(20): 2391–2405.

Baldazzi C., Luatti S., Zuffa E., Papayannidis C., Ottaviani E., Marzocchi G., Ameli G., Bardi M. A., Bonaldi L., Paolini R., Gurrieri C., Rigolin G. M., Cuneo A., Martinelli G., Cavo M. *et* Testoni N. (2016): Complex chromosomal rearrangements leading to *MECOM* overexpression are recurrent in myeloid malignancies with various 3q abnormalities. *Genes, Chromosomes & Cancer* 55(4): 375–388.

Barzi A. *et* Sekeres M. A. (2010): Myelodysplastic syndromes: A practical approach to diagnosis and treatment. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 77(1): 37–44.

Bejar R., Levine R. *et* Ebert B. L. (2011a): Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology* 29(5): 504–515.

Bejar R., Stevenson K. E., Abdel-Wahab O., Galili N., Nilsson B., Garcia-Manero G., Kantarjian H., Raza A., Levine R. L., Neuberg D. *et* Ebert B. L. (2011b): Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine* 364(26): 2496–2506.

Bejar R., Stevenson K. E., Caughey B. A., Abdel-Wahab O., Steensma D. P., Galili N., Raza A., Kantarjian H., Levine R. L., Neuberg D., Garcia-Manero G. *et* Ebert B. L. (2012): Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology* 30(27): 3376–3382.

Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M. T., Flandrin G., Galton D. A. G., Gralnick H. R. *et* Sultan C. (1976): Proposals for the classification of the Acute Leukaemias. *British Journal of Haematology* 33: 451–458.

Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M. T., Flandrin G., Galton D. A. G., Gralnick H. R. *et* Sultan C. (1982): Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* 51: 189–199.

Berthon C., Raffoux E., Thomas X., Vey N., Gomez-Roca C., Yee K., Taussig D. C., Rezai K., Roumier C., Herait P., Kahatt C., Quesnel B., Michallet M., Recher C., Lokiec F., Preudhomme C. *et* Dombret H. (2016): Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study. *The Lancet Haematology* 3(4): e186–195.

Bělohávková P. *et* Rohoň P. (2016): Myelodysplastický syndrom. In: Rohoň P. (ed.): Nové možnosti v léčbě vybraných hematologických onemocnění pp. 63–79, Mladá fronta a. s., Praha.

Bourková L., Jelínková M., Trnavská I. *et* Slánská M. (2011): Cytochemická vyšetření – Barvení zásobního železa. In: Penka M., Tesařová E. *et al.*: Hematologie a transfúzní lékařství I, p. 86, Grada Publishing, a.s., Praha.

Buliková A. (2000): Krvetvorba. In: Lexová S., Bourková L., Buliková A., Jarošová M. *et* Krahulcová E.: Hematologie pro zdravotní laboranty 1. díl, pp. 13–18, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno.

Buonamici S., Li D., Chi Y., Zhao R., Wang X., Brace L., Ni H., Sauntharajah Y. *et* Nucifora G. (2004): EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 114(5): 713–719.

Caponetti G. C. *et* Bagg A. (2020): Mutations in myelodysplastic syndromes: Core abnormalities and CHIPping away at the edges. *International Journal of Laboratory Hematology* 42(6): 671–684.

Collin M., Dickinson R. *et* Bigley V. (2015): Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *British Journal of Haematology* 169(2): 173–187.

Čermák J. (2013): Myelodysplastický syndrom. In: Pospíšilová Š., Dvořáková D. *et* Mayer J. (eds.): Molekulární hematologie, pp. 194–208, Galén, Praha.

Čermák J. (2016): Myelodysplastický syndrom v roce 2016. *Onkologie* 10(3): 114–119.

Čermák J. (2019): Posledních 25 let v diagnostice a léčbě myelodysplastického syndromu. *Transfúze a hematologie dnes* 1: 108–117.

Čermák J., Starý J., Jonášová A. *et* Kooperativní skupina pro MDS – Czech MDS Group (2020): Myelodysplastické syndromy. In: Doubek M. *et* Mayer J (eds): Léčebné postupy v hematologii 2020: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, pp. 137–152, Česká hematologická společnost ČLS JEP, Brno.

Čermák J., Vitek A., Mikulenkova D., Soukupova J., Brezinova J., Stastna M., Valkova V., Belickova M., Michalova K. *et* Cetkovsky P. (2018): An Analysis of Real Life Data Obtained from 30 Years Follow-up of Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) Patients Confirms a Leading Role of Stem Cell Transplantation (SCT) for Achievement of Prolonged Survival. *Blood* 132(1): 4372.

Červinek L. (2015): Myelodysplastický syndrom. *Onkologie* 9(3): 112–118.

De Braekeleer M., Le Bris M. J., De Braekeleer E., Basinko A., Morel F. *et* Douet-Guilbert N. (2015): 3q26/EVI1 rearrangements in myeloid hemopathies: a cytogenetic review. *Future Oncology* 11(11): 1675–1686.

Della Porta M. G., Tuechler H., Malcovati L., Schanz J., Sanz G., Garcia-Manero G., Solé F., Bennett J. M., Bowen D., Fenaux P., Dreyfus F., Kantarjian H., Kuendgen A., Levis A., Čermák J., Fonatsch C., Le Beau M. M., Slovak M. L., Krieger O., Luebbert M., Maciejewski J., Magalhaes S. M., Miyazaki Y., Pfeilstöcker M., Sekeres M. A., Sperr W. R., Stauder R., Tauro

S., Valent P., Vallespi T., van de Loosdrecht A. A., Germing U., Haase D., Greenberg P. L. *et* Cazzola M. (2015): Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM). *Leukemia* 29(7): 1502–1513.

Ebert B. L. (2011): Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Seminars in Oncology* 38(5): 621–626.

Ebert B. L., Pretz J., Bosco J., Chang C. Y., Tamayo P., Galili N., Raza A., Root D. E., Attar E., Ellis S. R. *et* Golub T. R. (2008): Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451(7176): 335–339.

Edelmann J., Holzmann K., Miller F., Winkler D., Buhler A., Zenz T., Bullinger L, Kühn M. W., Gerhardinger A., Bloehdorn J., Radtke I., Su X., Ma J., Pounds S., Hallek M., Lichter P., Korbel J., Busch R., Mertens D., Downing J. R., Stilgenbauer S. *et* Döhner H. (2012): High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 120(24): 4783–4794.

European Medicines Agency (EMA) webové stránky – informace o léčivém přípravku Reblozyl z 8.7.2020 [online] [navštíveno dne 19.2.2021]. Dostupné z <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/reblozyl>.

Fears S., Mathieu C., Zeleznik-Le N., Huang S., Rowley J. D. *et* Nucifora G. (1996): Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(4): 1642–1647.

Fenaux P., Mufti G. J., Hellstrom-Lindberg E., Santini V., Finelli C., Giagounidis A., Schoch R., Gattermann N., Sanz G., List A., Gore S. D., Seymour J. F., Bennett J. M., Byrd J., Backstrom J., Zimmerman L., McKenzie D., Beach C., Silverman L. R. *et* International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group (2009): Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology* 10(3): 223–232.

Fonatsch C., Gudat H., Lengfelder E., Wandt H., Silling-Engelhardt G., Ludwig W. D., Thiel E., Freund M., Bodenstein H. *et* Schwieder G. (1994): Correlation of cytogenetic findings with clinical features in 18 patients with inv(3)(q21q26) or t(3;3)(q21;q26). *Leukemia* 8(8): 1318–1326.

Ganguly B. B., Banerjee D. *et* Agarwal M. B. (2018): Impact of chromosome alterations, genetic mutations and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) on the classification and risk stratification of MDS. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 69: 90–100.

Genovese G., Kähler A., Handsaker R., Lindberg J., Rose S., Bakhoun S., Chambert K., Mick E., Neale B., Fromer M., Purcell S., Svantesson O., Landén M., Höglund M., Lehmann S., Gabriel S., Moran J., Lander E., Sullivan P., Sklar P., Grönberg H., Hultman C. *et* McCarroll S. (2014): Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *The New England Journal of Medicine* 371(26): 2477–2487.

- Gerds A. T., Gooley T. A., Estey E. H., Appelbaum F. R., Deeg H. J. *et* Scott B. L. (2012): Pretransplantation Therapy with Azacitidine vs Induction Chemotherapy and Posttransplantation Outcome in Patients with MDS. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 18(8): 1211–1218.
- Germing U., Gattermann N., Strupp C., Aivado M. *et* Aul C. (2000): Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leukemia Research* 24(12): 983–992.
- Germing U., Schroeder T., Kaivers J., Kündgen A., Kobbe G. *et* Gattermann N. (2019): Novel therapies in low- and high-risk myelodysplastic syndrome. *Expert Review of Hematology* 12(10): 893–908.
- Giagounidis A. *et* Haase D. (2013): Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 26(4): 337–353.
- Glass C., Wilson M., Gonzalez R., Zhang Y. *et* Perkins A. S. (2014): The role of *EVII* in myeloid malignancies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 53(1–2): 67–76.
- Greenberg P. L., Cox Ch., LeBeau M. M., Fenaux P., Morel P., Sanz G., Sanz M., Vallespi T., Hamblin T., Oscier D., Ohyashiki K., Toyama K., Aul C., Mufti G. *et* Bennett J. M. (1997): International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 89(6): 2079–2088.
- Greenberg P. L., Tuechler H., Schanz J., Sanz G., Garcia-Manero G., Solé F., Bennett J. M., Bowen D., Fenaux P., Dreyfus F., Kantarjian H., Kuendgen A., Levis A., Malcovati L., Cazzola M., Cermak J., Fonatsch C., Le Beau M. M., Slovak M. L., Krieger O., Luebbert M., Maciejewski J., Magalhaes S. M., Miyazaki Y., Pfeilstöcker M., Sekeres M., Sperr W. R., Stauder R., Tauro S., Valent P., Vallespi T., van de Loosdrecht A. A., Germing U. *et* Haase D. (2012): Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 120(12): 2454–2465.
- Gröschel S., Sanders M. A., Hoogenboezem R., de Wit E., Bouwman B. A. M., Erpelinck C., van der Velden V. H. J., Havermans M., Avellino R., van Lom K., Rombouts E. J., van Duin M., Döhner K., Beverloo H. B., Bradner J. E., Döhner H., Löwenberg B., Valk P. J. M., Bindels E. M. J., de Laat W. *et* Delwel R. (2014): A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant *EVII* and *GATA2* deregulation in leukemia. *Cell* 157(2): 369–381.
- Gröschel S., Sanders M. A., Hoogenboezem R., Zeilemaker A., Havermans M., Erpelinck C., Bindels E. M., Beverloo H. B., Döhner H., Löwenberg B., Döhner K., Delwel R. *et* Valk P. J. (2015): Mutational spectrum of myeloid malignancies with *inv(3)/t(3;3)* reveals a predominant involvement of RAS/RTK signaling pathways. *Blood* 125(1): 133–139.
- Haase D., Germing U., Schanz J., Pfeilstöcker M., Nösslinger T., Hildebrandt B., Kundgen A., Lübbert M., Kunzmann R., Giagounidis A. A., Aul C., Trümper L., Krieger O., Stauder R., Müller T. H., Wimazal F., Valent P., Fonatsch C. *et* Steidl C. (2007): New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110(13): 4385–4395.

Haferlach C., Bacher U., Grossmann V., Schindela S., Zenger M., Kohlmann A., Kern W., Haferlach T. *et* Schnittger S. (2012): Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases. *Genes, Chromosomes and Cancer* 51(12): 1079–1085.

Haferlach T. (2019): The Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndrome. *Pathobiology* 86(1): 24–29.

Haferlach T., Nagata Y., Grossmann V., Okuno Y., Bacher U., Nagae G., Schnittger S., Sanada M., Kon A., Alpermann T., Yoshida K., Roller A., Nadarajah N., Shiraishi Y., Shiozawa Y., Chiba K., Tanaka H., Koefler H. P., Klein H. U., Dugas M., Aburatani H., Kohlmann A., Miyano S., Haferlach C., Kern W. *et* Ogawa S. (2014): Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28: 241–247.

Helbling D., Mueller B. U., Timchenko N. A., Hagemeijer A., Jotterand M., Meyer-Monard S., Lister A., Rowley J. D., Huegli B., Fey M. F. *et* Pabst T. (2004): The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EVI1 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(36): 13312–13317.

Hofmann W.-K. *et* Koefler H. P. (2005): Myelodysplastic syndrome. *Annual Review of Medicine* 56(1): 1–16.

Chakraborty S., Senyuk V., Sitailo S., Chi Y. *et* Nucifora, G. (2001): Interaction of EVI1 with cAMP-responsive Element-binding Protein-binding Protein (CBP) and p300/CBP-associated Factor (P/CAF) Results in Reversible Acetylation of EVI1 and in Co-localization in Nuclear Speckles. *Journal of Biological Chemistry* 276(48): 44936–44943.

Chung S. S. *et* Park Ch. Y. (2017): Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. *Blood Advances* 1(26): 2572–2578.

Ijpm A. (2011), e-seminář Agilent CytoGenomics 2.0 [online] [navštíveno 2.1.2021]. Dostupné z https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Cyto2.0eseminarArne_12092011.pdf.

Jaiswal S., Fontanillas P., Flannick J., Manning A., Grauman P. V., Mar B. G., Lindsley R. C., Mermel C. H., Burt N., Chavez A., Higgins J. M., Moltchanov V., Kuo F. C., Kluk M. J., Henderson B., Kinnunen L., Koistinen H., Ladenvall C., Getz G., Correa A., Banahan B., Gabriel S., Kathiresan S., Stringham H., McCarthy M., Boehnke M., Tuomilehto J., Haiman C., Groop L., Atzmon G., Wilson J., Neuberg D., Altshuler D. *et* Ebert B. L. (2014): Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *The New England Journal of Medicine* 371(26): 2488–9248.

Juránová J. *et* Faber E. (2015): Popis jednotlivých druhů normálních buněk v periferní krvi a kostní dřeni. In: Faber E. (ed.): *Základy hematologické diagnostiky*, pp 43–55, Mladá fronta a.s., Praha.

Kadlčková E. *et* Rohoň P. (2014): Nové možnosti v léčbě myelodysplastického syndromu. *Onkologie* 8(1): 28–33.

Kennedy J. A. *et* Ebert B. L. (2017): Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *Journal of Clinical Oncology* 35(9): 968–974.

Killick S. B., Carter C., Culligan D., Dalley C., Das-Gupta E., Drummond M., Enright H., Jones G. L., Kell J., Mills J., Mufti G., Parker J., Raj K., Sternberg A., Vyas P., Bowen D. *et* British Committee for Standards in Haematology (2014): Guidelines for the diagnosis and management of adult myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* 164(4): 503–525.

Kissová J. (2011): Myelodysplastický syndrom (MDS). In: Penka M., Tesařová E. *et al.*: Hematologie a transfúzní lékařství I, pp. 314–323, Grada Publishing, a.s., Praha.

Kolquist K. A., Schultz R. A., Furrow A., Brown T. C., Han J. Y., Campbell L. J., Wall M., Slovak M. L., Shaffer L. G. *et* Ballif B. C. (2011): Microarray-based comparative genomic hybridization of cancer targets reveals novel, recurrent genetic aberrations in the myelodysplastic syndromes. *Cancer Genetics* 204(11): 603–628.

Krahulcová E. (2000): Myelodysplastický syndrom. In: Lexová S., Bourková L., Buliková A., Jarošová M. *et* Krahulcová E.: Hematologie pro zdravotní laboranty 1. díl, pp. 115–119, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno.

Krejčí M., Šmardová J., Adam Z. *et* Mayer J. (2008): Myelodysplastický syndrom (MDS). In: Adam Z., Krejčí M. *et* Vorlíček J. (eds.): Hematologie – přehled maligních hematologických nemocí, pp. 19–27, Grada Publishing, a.s., Praha.

Kuglík P. (2013): Molekulárně cytogenetické metody. In: Pospíšilová Š., Dvořáková D. *et* Mayer J. (eds.): Molekulární hematologie, pp. 111–119, Galén, Praha.

Kumar M. S., Narla A., Nonami A., Mullally A., Dimitrova N., Ball B., McAuley J. R., Poveromo L., Kutok J. L., Galili N., Raza A., Attar E., Gilliland D. G., Jacks T. *et* Ebert B. L. (2011): Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q- syndrome. *Blood* 118(17): 4666–4673.

Kunacheewa C., Ungprasert P., Phikulsod P., Issaragrisil S. *et* Owattanapanich W. (2020): Comparative Efficacy and Clinical Outcomes of Haploidentical Stem Cell Transplantation to Other Stem Sources for Treatment in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cell Transplantation* 29: 1–15.

List A., Kurtin S., Roe D. J., Buresh A., Mahadevan D., Fuchs D., Rimsza L., Heaton R., Knight R. *et* Zeldis J. B. (2005): Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine* 352(6): 549–557.

Lugthart S., Gröschel S., Beverloo H. B., Kayser S., Valk P. J., van Zelder-Bhola S. L., Jan Ossenkuppele G., Vellenga E., van den Berg-de Ruyter E., Schanz U., Verhoef G., Vandenberghe P., Ferrant A., Köhne C. H., Pfreundschuh M., Horst H. A., Koller E., von Lilienfeld-Toal M., Bentz M., Ganser A., Schlegelberger B., Jotterand M., Krauter J., Pabst T., Theobald M., Schlenk R. F., Delwel R., Döhner K., Löwenberg B. *et* Döhner H. (2010): Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type *inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2)* and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 28(24): 3890–3898.

Makishima H., Yoshizato T., Yoshida K., Sekeres M. A., Radivoyevitch T., Suzuki H., Przychodzen B., Nagata Y., Meggendorfer M., Sanada M., Okuno Y., Hirsch C., Kuzmanovic T., Sato Y., Sato-Otsubo A., LaFramboise T., Hosono N., Shiraishi Y., Chiba K., Haferlach C., Kern W., Tanaka H., Shiozawa Y., Gómez-Seguí I., Husseinzadeh H. D., Thota S., Guinta K. M., Dienes B., Nakamaki T., Miyawaki S., Sauntharajah Y., Chiba S., Miyano S., Shih L. Y., Haferlach T., Ogawa S. *et* Maciejewski J. P. (2017): Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics* 49(2): 204–212.

Malcovati L. *et* Nimer S. D. (2008): Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Staging. *Cancer Control* 15(4): 4–13.

Malcovati L., Germing U., Kuendgen A., Della Porta M. G., Pascutto C., Invernizzi R., Giagounidis A., Hildebrandt B., Bernasconi P., Knipp S., Strupp C., Lazzarino M., Aul C. *et* Cazzola M. (2007): Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology* 25(23): 3503–3510.

Malcovati L., Hellström-Lindberg E., Bowen D., Adès L., Cermak J., Del Cañizo C., Della Porta M. G., Fenaux P., Gattermann N., Germing U., Jansen J. H., Mittelman M., Mufti G., Platzbecker U., Sanz G. F., Selleslag D., Skov-Holm M., Stauder R., Symeonidis A., van de Loosdrecht A. A., de Witte T. *et* Cazzola M. (2013): Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 122(17): 2943–2964.

Málek F. (2005): Myelodysplastický syndrom – pohled internisty. *Interní medicína pro praxi* 7(2): 65–69.

McGowan-Jordan J., Simons A. *et* Schmid M. (eds) (2016): *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (2016). S. Karger AG, Basel.

McNerney M. E., Brown C. D., Wang X., Bartom E. T., Karmakar S., Bandlamudi C., Yu S., Ko J., Sandall B. P., Stricker T., Anastasi J., Grossman R. L., Cunningham J. M., Le Beau M. M. *et* White K. P. (2013): CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. *Blood* 121(6): 975–983.

MetaSystems Probes, příbalové informace o produktu D-5124-100-OG – XL t(3;3) GATA2/MECOM DF, 2017 [online] [navštíveno 12.3.2021]. Dostupné z <https://metasystems-probes.com/site/templates/images/probes/FACTS/FACTS-EN/PFS-D-5124-100-OG-EN.pdf>.

Michalová K. (1999): Úvod do lidské cytogenetiky. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno.

Morishita K., Parker D. S., Mucenski M. L., Jenkins N. A., Copeland N. G. *et* Ihle J. N. (1988): Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 54(6): 831–840.

Nazha A., Narkhede M., Radivoyevitch T., Seastone D. J., Patel B. J., Gerds A. T., Mukherjee S., Kalaycio M., Advani A., Przychodzen B., Carraway H. E., Maciejewski J. P. *et* Sekeres M. A. (2016): Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 30(11): 2214–2220.

- Neuwirtová R. (2005): Myelodysplastický syndrom: onkohematologické onemocnění vyššího věku. *Česká Geriatrická Revue* 3(2): 21–28.
- Nikoloski G., Langemeijer S. M., Kuiper R. P., Knops R., Massop M., Tönnissen E. R., van der Heijden A., Scheele T. N., Vandenberghe P., de Witte T., van der Reijden B. A. *et* Jansen J. H. (2010): Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics* 42(8): 665–667.
- Nobili L., Lionetti M. *et* Neri A. (2016): Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Oncotarget* 7(31): 50666–50681.
- Novotný J., Jelínková M., *et* Penka M. (2011): Fyziologie krvetvorby. In: Penka M., Tesařová E. *et al.*: *Hematologie a transfúzní lékařství I*, pp. 15–30, Grada Publishing, a.s., Praha.
- Nucifora G. (1997): The *EVII* gene in myeloid leukemia. *Leukemia* 11(12): 2022–2031.
- Pavlová Š., Létalová E. *et* Doubek M. (2013): Hematopoéza, imunitní systém, přestavby imunoglobulinů. In: Pospíšilová Š., Dvořáková D. *et* Mayer J. (eds.): *Molekulární hematologie*, pp. 65–70, Galén, Praha.
- Pecka M. (2006a): Myelodysplastický syndrom (MDS). In: Pecka M. (ed): *Laboratorní hematologie v přehledu – Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*, pp. 248–255, FINIDR, s. r. o., Český Těšín.
- Pecka M. (2006b): Změny morfologie bílé krvinky. In: Pecka M. (ed): *Laboratorní hematologie v přehledu – Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*, pp. 45–46, FINIDR, s. r. o., Český Těšín.
- Peeters P., Wlodarska I., Baens M., Criel A., Selleslag D., Hagemeijer A., Van den Berghe H. *et* Marynen P. (1997): Fusion of ETV6 to MDS1/EVI1 as a result of t(3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders. *Cancer Research* 57(4): 564–569.
- Pellagatti A. *et* Boultonwood J. (2015): The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *The European Journal of Haematology* 95(1): 3–15.
- Penka M. (1996): Krvetvorba. In: Krahulcová E., Matýšková M. *et* Penka M.: *Hematologie pro zdravotní sestry na transfúzních odděleních*, pp. 11–16, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno.
- Pinheiro I., Margueron R., Shukeir N., Eisold M., Fritsch C., Richter F. M., Mittler G., Genoud C., Goyama S., Kurokawa M., Son J., Reinberg D., Lachner M. *et* Jenuwein T. (2012): Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* 150(5): 948–960.
- Poppe B., Dastugue N., Vandesompele J., Cauwelier B., De Smet B., Yigit N., De Paepe A., Cervera J., Recher C., De Mas V., Hagemeijer A. *et* Speleman F. (2006): EVI1 is consistently expressed as principal transcript in common and rare recurrent 3q26 rearrangements. *Genes, Chromosomes & Cancer* 45(4): 349–356.

Porto M. L., Rodrigues B. P., Menezes T. N., Ceschim S. L., Casarini D. E., Gava A. L., Pereira T. M. C., Vasquez E. C., Campagnaro B. P. *et* Meyrelles S. S. (2015): Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *Journal of Biomedical Science* 22(1): 97–109.

Pospíšilová Š., Čech Z., Kuglík P. *et* Kovářová L. (2011): Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření. In: Penka M., Tesařová E. (eds): *Hematologie a transfúzní lékařství I*, pp. 118–126, Grada Publishing, a.s., Praha.

Rheingold J. J., Kaufman R., Adelson E. *et* Lear A. (1963): Smoldering Acute Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 268(15): 812–815.

Ridgeway J. A., Tinsley S. *et* Kurtin S. E. (2017): Practical Guide to Bone Marrow Sampling for suspected Myelodysplastic Syndromes. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* 8(1): 29–39.

Rigolin G. M., Bigoni R., Milani R., Cavazzini F., Roberti M. G., Bardi A., Agostini P., Della Porta M., Tieghi A., Piva N., Cuneo A. *et* Castoldi G. (2001): Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 15(12): 1841–1847.

Rogers H. J., Vardiman J. W., Anastasi J., Raca G., Savage N. M., Cherry A. M., Arber D., Moore E., Morrissette J. J., Bagg A., Liu Y. C., Mathew S., Orazi A., Lin P., Wang S. A., Bueso-Ramos C. E., Foucar K., Hasserjian R. P., Tiu R. V., Karafa M. *et* Hsi E. D. (2014): Complex or monosomal karyotype and not blast percentage is associated with poor survival in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with *inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2)*: a Bone Marrow Pathology Group study. *Haematologica* 99(5): 821–829.

Sallman D. A., Al Ali N., Padron E., Lancet J., List A. *et* Komrokji R. (2015): Chromosomal 3 Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: Implications on Prognosis and Response to Treatment. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*: 15: S232.

Sallman D. A., Barnard J., Al Ali N. H., Garcia-Manero G., Sekeres M. A., DeZern A., Steensma D. P., Roboz G., Jabbour E., Maciejewski J. P., Pierce S., Padron E., Lancet J. E., Kantarjian H., List A. F. *et* Komrokji R. S. (2020): Hypomethylating Agent Therapy in Myelodysplastic Syndromes With Chromosome 3 Abnormalities. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 20(9): e597–e605.

Shallis R. M., Ahmad R. *et* Zeidan A. M. (2018): The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *The European Journal of Haematology* 101(3): 260–271.

Shih A. H., Abdel-Wahab O., Patel J. P. *et* Levine R. L. (2012): The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature Reviews Cancer* 12(9): 599–612.

Shimizu R. *et* Yamamoto M. (2016): GATA2 (GATA binding protein 2). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 20(8): 437–440. [online] [navštíveno dne 2.3.2021] Dostupné z <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GATA2ID44160ch3q21.html>.

Schanz J., Cevik N., Fonatsch C., Bräulke F., Shirneshan K., Bacher U. *et* Haase D. (2018): Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. *Blood Cancer Journal* 8: 28–37.

Schanz J., Tüchler H., Solé F., Mallo M., Luño E., Cervera J., Granada I., Hildebrandt B., Slovak M. L., Ohyashiki K., Steidl C., Fonatsch C., Pfeilstöcker M., Nösslinger T., Valent P., Giagounidis A., Aul C., Lübbert M., Stauder R., Krieger O., Garcia-Manero G., Faderl S., Pierce S., Le Beau M. M., Bennett J. M., Greenberg P., Germing U. *et* Haase D. (2012): New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an International database merge. *Journal of Clinical Oncology* 30(8): 820–829.

Schoumans J., Suela J., Hastings R., Muehlematter D., Rack K., van den Berg E., Berna Beverloo H. *et* Stevens-Kroef M. (2016): Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Genes, Chromosomes & Cancer* 55(5): 480–491.

Schroeder T., Rachlis E., Bug G., Stelljes M., Klein S., Steckel N. K., Wolf D., Ringhoffer M., Czibere A., Nachtkamp K., Dienst A., Kondakci M., Stadler M., Platzbecker U., Uharek L., Luft T., Fenk R., Germing U., Bornhäuser M., Kröger N., Beelen D. W., Haas R. *et* Kobbe G. (2015): Treatment of Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation with Azacitidine and Donor Lymphocyte Infusions – A Retrospective Multicenter Analysis from the German Cooperative Transplant Study Group. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 21(4): 653–660.

Sloand E. M., Mainwaring L., Fuhrer M., Ramkissoon S., Risitano A. M., Keyvanafar K., Lu J., Basu A., Barrett A. J. *et* Young N. S. (2005): Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood* 106(3): 841–851.

Sloand E. M., Pfannes L., Chen G., Shah S., Solomou E. E., Barrett J. *et* Young N. S. (2007): CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* 109(6): 2399–2405.

Soderholm J., Kobayashi H., Mathieu C., Rowley J. D. *et* Nucifora G. (1997): The leukemia-associated gene MDS1/EV11 is a new type of GATA-binding transactivator. *Leukemia* 11(3): 352–358.

Speicher M. R., Ballard S. G. *et* Ward D. C. (1996): Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12(4): 368–375.

Steensma D. P. (2018): Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer Journal* 8(5): 47–54.

Stein S., Ott M. G., Schultze-Strasser S., Jauch A., Burwinkel B., Kinner A., Schmidt M., Krämer A., Schwäble J., Glimm H., Koehl U., Preiss C., Ball C., Martin H., Göhring G., Schwarzwaelder K., Hofmann W. K., Karakaya K., Tchatchou S., Yang R., Reinecke P., Kühlcke K., Schlegelberger B., Thrasher A. J., Hoelzer D., Seger R., von Kalle C. *et* Grez M. (2010): Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EV11 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nature Medicine* 16(2): 198–204.

Steinleitner K., Rampetsreiter P., Köffel R., Ramanathan G., Mannhalter C., Strobl H. *et* Wieser R. (2012): EV11 and MDS1/EV11 expression during primary human hematopoietic progenitor cell differentiation into various myeloid lineages. *Anticancer Research* 32(11): 4883–4889.

- Suzukawa K., Parganas E., Gajjar A., Abe T., Takahashi S., Tani K., Asano S., Asou H., Kamada N., Yokota J., Morishita K. *et* Ihle J. N. (1994): Identification of a breakpoint cluster region 3' of the ribophorin I gene at 3q21 associated with the transcriptional activation of the *EVII* gene in acute myelogenous leukemias with *inv(3)(q21q26)*. *Blood* 84(8): 2681–2688.
- Syed J., Pandian G. N., Sato S., Taniguchi J., Chandran A., Hashiya K., Bando T. *et* Sugiyama H. (2014): Targeted suppression of *EVI1* oncogene expression by sequence-specific pyrrole-imidazole polyamide. *Chemistry & Biology* 21(10): 1370–1380.
- Tang Z., Tang G., Hu S., Patel K P., Yin C. C., Wang W., Lin P., Toruner G. A., Ok C. Y., Gu J., Lu X., Khoury J. D. *et* Medeiros L. J. (2019): Deciphering the complexities of *MECOM* rearrangement-driven chromosomal aberrations. *Cancer Genetics* 233: 21–31.
- Trněný M., Čermák J., Klamová H., Šálek C., Cieslar P., Salaj P., Kvasnička J., Písačka M. *et* Gašová Z. (2020): Poruchy erytrocytů. In: Češka R., Štulc T., Tesař V. *et* Lukáš M. (eds.): *Interna*, pp. 708–710, Triton, Praha.
- Valent P., Orazi A., Steensma D. P., Ebert B. L., Haase D., Malcovati L., van de Loosdrecht A., Haferlach T., Westers T. M., Wells D. A., Giagounidis A., Loken M., Orfao A., Lübbert M., Ganser A., Hofmann W. K., Ogata K., Schanz J., Béné M. C., Hoermann G., Sperr W. R., Sotlar K., Bettelheim P., Stauder R., Pfeilstöcker M., Horny H. P., Germing U., Greenberg P. *et* Bennett J. M. (2017): Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget* 8(43): 73483–73500.
- Vardiman J. W., Thiele J., Arber D. A., Brunning R. D., Borowitz M. J., Porwit A., Harris N. L., Le Beau M. M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A. *et* Bloomfield C. D. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114(5): 937–951.
- Vinatzer U., Taplick J., Seiser C., Fonatsch C. *et* Wieser R. (2001): The leukaemia-associated transcription factors *EVI-1* and *MDS1/EVI1* repress transcription and interact with histone deacetylase. *The British Journal of Haematology* 114(3): 566–573.
- Vondráková J. (2010): Myelodysplastický syndrom, diagnostika a léčba. *Interní medicína pro praxi* 12(11): 535–539.
- Vondráková J. *et* Rohoň P. (2015): Myelodysplastický syndrom. In: Faber E. (ed.): *Základy hematologické diagnostiky*, pp 164–171, Mladá fronta a. s., Praha.
- Wanquet A., Prebet T., Berthon C., Sebert M., Roux C., Kulasekararaj A., Micol J.-B., Esterni B., Itzykson R., Thepot S., Recher Ch., Delaunay J., Dreyfus F., Mufti G., Fenaux P. *et* Vey N. (2015): Azacitidine treatment for patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 3q abnormalities. *American Journal of Hematology* 90(10): 859–863.
- Wieser R. (2007): The oncogene and developmental regulator *EVI1*: Expression, biochemical properties, and biological functions. *Gene* 396(2): 346–357.

Wieser R. (2016): MECOM (Ecotropic Viral Integration Site 1 (EVI1) and Myelodysplastic Syndrome 1 (MDS1-EVI1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 20(4): 185–194. [online] [navštíveno dne 1.3.2021] Dostupné z http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/GC_MECOM.html#LINKS.

Yamaoka A., Suzuki M., Katayama S., Orihara D., Engel J. D. *et* Yamamoto M. (2020): EVI1 and GATA2 misexpression induced by inv(3)(q21q26) contribute to megakaryocyte-lineage skewing and leukemogenesis. *Blood Advances* 4(8): 1722–1736.

Yamazaki H., Suzuki M., Otsuki A., Shimizu R., Bresnick E. H., Engel J. D. *et* Yamamoto M. (2014): A Remote GATA2 Hematopoietic Enhancer Drives Leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by Activating EVI1 Expression. *Cancer Cell* 25(4): 415–427.

Yoshimi A. *et* Kurokawa M. (2011): *Evi1* forms a bridge between the epigenetic machinery and signaling pathways. *Oncotarget* 2(7): 575–586.

Zahid M. F., Malik A., Sohail M., Hassan I. N., Ali S. *et* Shaukat M. H. S. (2017): Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *Internatiol Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 11(3): 231–239.

Zemanova Z., Michalova K., Buryova H., Brezinova J., Kostylkova K., Bystricka D., Novakova M., Sarova I., Izakova S., Lizcova L., Ransdorfova S., Krejcik Z., Merkerova M. D., Dohnalova A., Siskova M., Jonasova A., Neuwirtova R. *et* Cermak J. (2014): Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leukemia Research* 38(5): 537–544.

Zemanova Z., Michalova K., Svobodova K., Brezinova J., Lhotska H., Lizcova L., Sarova I., Izakova S., Hodanova L., Vesela D., Ransdorfova S., Belickova M., Vesela J., Polackova H., Siskova M., Neuwirtova R., Cermak J., Stopka T. *et* Jonasova A. (2018): Chromothripsis in High-Risk Myelodysplastic Syndromes: Incidence, Genetic Features, Clinical Implications, and Impact on Survival of Patients Treated with Azacytidine (Data from Czech MDS Group). *Blood* 132(1): 1815.

Zhang Y., Sicot G., Cui X., Vogel M., Wuertzer C. A., Lezon-Geyda K., Wheeler J., Harki D. A., Muzikar K. A., Stolper D. A., Dervan P. B. *et* Perkins A. S. (2011): Targeting a DNA binding motif of the EVI1 protein by a pyrrole-imidazole polyamide. *Biochemistry* 50(48): 10431–10441.