

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Olomouc 2017

Martina Onderková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulární cytogenetika nehodgkinských
lymfomů**

Bakalářská práce

Martina Onderková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci na téma “Molekulární cytogenetika nehodgkinských lymfomů “ vypracovala samostatně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Martina Onderková

SOUHRN

Předkládaná bakalářská práce s názvem „Molekulární cytogenetika nehodgkinských lymfomů“ se zabývá studiem chromosomových změn a jejich klinickém významu u pacientů s nehodgkinským lymfomem vyšetřovaných na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V teoretické části je shrnuta problematika nehodgkinských lymfomů, jejich současná klasifikace, dále základní poznatky a informace o hematopoéze a o metodách cytogenetiky a molekulární cytogenetiky.

V rámci praktické části bakalářské práce byla provedena molekulárně cytogenetická analýza FISH u souboru 24 pacientů. Soubor pacientů byl rozdělen do 4 skupin na základě diagnózy jednotlivých subtypů. Jednalo se o pacienty s difúzním B velkobuněčným lymfomem (DLBCL), folikulárním lymfomem (FL), lymfomem z plášťových buněk (MCL) a lymfomem marginální zóny (MZL). Vyšetřovanými změnami u pacientů s DLBCL a FL byla přestavba genu *BCL2* a následná fúze genu *BCL2* a *IgH*. U DLBCL dále nadpočetné kopie genu *MYC* a *BCL6*. U pacientů s MCL byla vyšetřována translokace t(11;14)(q13;q32) a fúze genu *BCL1* a *IgH* a u pacientů s MZL byla studována přestavba genu *MALT1*.

Bakalářská práce potvrdila význam molekulárně cytogenetické analýzy u nemocných s NHL.

SUMMARY

The presented bachelor thesis entitled “Molecular cytogenetics of non-Hodgkin’s lymphomas” deals with the study of chromosomal abnormalities and their prognostic factors in patients with non-Hodgkin’s lymphoma treated at Hemato-Oncology, University Hospital and Medical Faculty of Palacky University in Olomouc.

The theoretical part summarizes the issue of non-Hodgkin’s lymphomas, their current classification, basic knowledge and information on hematopoiesis and methods of cytogenetics and molecular cytogenetics.

In the practical part of thesis was examined molecular cytogenetic analysis FISH in a group of 24 patients. The patients group was divided into 4 groups based on the diagnosis of individual subtypes. These were patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL) and marginal zone lymphoma (MZL). The conversion of the gene *BCL2* and subsequent fusion of the gene *BCL2* and *IgH* were detected in the patients with DLBCL and FL. Furthermore redundant copies of the gene *MYC* and *BCL6* were detected in the DLBCL patients. The translocation t(11;14)(q13;q32) fusion of genes *BCL1* and *IgH* was diagnosed in the patients with MCL and the conversion of *MALT1* gene was studied in patients with MZL.

This thesis confirmed importance of molecular cytogenetic method in the patients with NHL.

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc. za vedení, odborné rady, trpělivost a příjemnou spolupráci. Velké dík patří také Mgr. Michaele Vatulíkové za seznámení s prací v laboratoři a cenné rady při vypracovávání bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky (RNDr. Mileně Holzerové, Mgr. Lence Krůzové, Mgr. Miroslavě Vincové) za příjemnou spolupráci.

V neposlední řadě děkuji své rodině za psychickou a finanční podporu po celou dobu studia.

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Cíle práce	2
3.	Současný stav řešené problematiky	3
3.1.	Hematopoéza.....	3
3.2.	Vývoj krevních buněk	4
3.2.1.	Lymfopoéza	4
3.2.2.	Vývoj B-lymfocyty.....	5
3.3.	Cytogenetika a molekulární cytogenetika	6
3.3.1.	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) a metoda mnohobarevné FISH (mFISH)	9
3.4.	Nehodgkinské lymfomy (NHL).....	10
3.4.1.	Patogeneze.....	10
3.4.2.	Diagnostika	11
3.4.3.	Léčba	12
3.5.	Klasifikace NHL.....	13
3.5.1.	Folikulární lymfom (FL).....	14
3.5.2.	Difúzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL).....	15
3.5.3.	Lymfom z plášťových buněk (Mantle cell lymphoma - MCL).....	19
3.5.4.	Lymfom marginální zóny (MZL).....	20
3.5.5.	Burkittův lymfom (BL).....	21
4.	Metody a materiál	24
4.1.	Biologický materiál	24
4.1.1.	Kultivace biologického materiálu	24
4.1.2.	Zpracování biologického materiálu	25
4.2.	Molekulární cytogenetika.....	26
4.2.1.	FISH (Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace)	27
5.	Výsledky	29
5.1.	Výsledky vstupního cytogenetického vyšetření.....	31

5.2.	Vyhodnocení souboru pacientů metodou FISH	33
5.2.1.	Soubor pacientů s difúzním B velkobuněčným lymfomem (DLBCL)	33
5.2.2.	Soubor pacientů s folikulárním lymfomem (FL)	34
5.2.3.	Soubor pacientů pro s lymfomem z plášťových buněk (MCL – Mantle cell lymphoma).....	36
5.2.4.	Soubor pacientů s lymfomem marginální zóny – MALT (MZL)	37
5.2.5.	Celkové vyhodnocení výsledků vyšetřovaného souboru.....	38
6.	Diskuze	40
7.	Závěr	43
8.	Citace	44
9.	Seznam použitých zkratk	52

1. Úvod

Nehodgkinské lymfomy (NHL) jsou heterogenní skupinou hematologických malignit vznikajících z lymfatické tkáně (Sýrová *et al.*, 2010). Jedná se o nádorová onemocnění se stoupající incidencí, současně však jde o jedny z nejlépe léčitelných malignit. Diagnostika a zjišťování rozsahu onemocnění se v současné době zpřesnily díky používání imunohistochemických vyšetření molekulárně genetických metod a pozitronové emisní tomografie (Pytlík, 2013). Medián věku pacientů v době diagnosy je 65 let. Tyto nádory bývají častější u mužů a to v poměru M:Ž asi 1,8:1 (Indrák, 2006/2007). Součástí vyšetřovacích metod je také cytogenetické vyšetření nádorové tkáně pro určení rekurentních genetických změn. Bylo potvrzeno, že genetické změny charakterizují různé podtypy NHL a mají klinický význam.

2. Cíle práce

1. Vypracování rešerše bakalářské práce na téma molekulární cytogenetika ne Hodgkinových lymfomů (NHL).
2. Shrnutí základních informací o NHL, molekulárně cytogenetických metodách a cytogenetických změnách u pacientů s NHL.
3. Sledování chromosomových změn pomocí metody FISH (fluorescenční in situ hybridizace) u vybraného souboru pacientů s NHL.

3. Současný stav řešené problematiky

3.1. Hematopoéza

Hematopoéza, též krvetvorba, je proces tvorby krevních buněk v krvetvorných orgánech. Jedná se o nesmírně komplikovaný a komplexně řízený proces. Krvetvorba probíhá v průběhu života ve dvou fázích: prenatalní a postnatální (Pecka, 2002). Prenatální krvetvorba začíná již v raném období těhotenství a dělí se na tři období: mezoblastové, hepatolienální (jaterní) a medulární (dřeňové) (Rodak *et al.*, 2007).

Mezoblastové období, kde první krvinky vznikají z mezodermy žloutkového vaku, začíná již 3. týden zárodečného života. V ostrůvcích mezoblastu se vytváří základy cév. V tomto období se také tvoří základ thymu, který osídluje kmenovými buňkami, ze kterých se postupně tvoří mateřské buňky lymfocytů.

V hepatolienálním období, které začíná po 6. týdnu zárodečného života, se začínají tvořit krvetvorné buňky z mezenchymu uloženého mezi jaterními buňkami, takže hlavním místem krvetvorby tohoto období jsou játra. Lymfocyty vznikají z pluripotentních kmenových buněk, které jsou v krevním řečišti již od 12. týdne vývoje plodu a jsou zaneseny do primárních lymfatických orgánů (thymus a kostní dřeň). V 3. měsíci vývoje dochází také k vývoji sekundárních lymfatických orgánů. (Zvárová, Celerová, 2011).

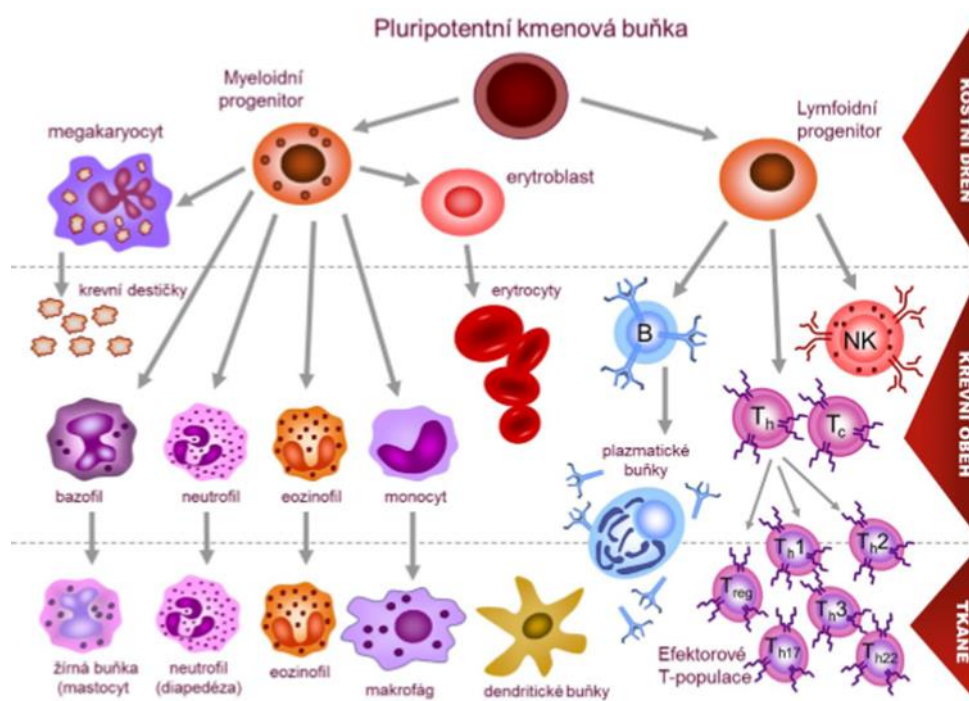
V poslední fázi prenatalního vývoje, tedy od 20. týdne, se krvetvorba soustřeďuje do kostní dřeně. Mímodřeňová (extramedulární) krvetvorba zaniká ve 2. – 3. týdnu po porodu za současného zvýšení dřeňové krvetvorby. Po narození tedy dochází k přechodu na postnatální (poporodní) krvetvorbu. Ta za normálních podmínek probíhá pouze v kostní dřeni, která je zásobárnou všech druhů krvinek. Extramedulární krvetvorba se však může obnovit za stavu větší potřeby tvorby krevních buněk jako je např. krvácení, nadměrný rozpad krvinek a u nemocí krvetvorby (Zvárová, Celerová 2011).

Zralé krevní buňky přestupují z parenchymu kostní dřeně skrze tenkou vrstvu endotelových buněk – sinusoid (Pecka, 2002). Přejít do krve je zajišťován různými mechanismy. Bílé krvinky prostupují do krve diapedézou (aktivní pohyb), červené krvinky, po vypuzení jádra, procházejí díky schopnosti měnit svůj tvar, kdy po vstupu do cévy svůj původní tvar obnoví a trombocyty jsou uvolňovány do nitra cév proudem krve, který uvolňuje tyto zralé trombocyty z výběžků megakaryocytů mezi endotelovými buňkami.

3.2. Vývoj krevních buněk

Všechny krevní buňky se vyvíjí z pluripotentní kmenové buňky (HSC – Hematopoetic stem cells). Tyto kmenové buňky, jejíž základní vlastností je schopnost sebeobnovy, se nacházejí v malém množství v kostní dřeni a vytváří a udržují krevní systém (Orkin, 2008). Hematopoetické kmenové buňky vedou na základě schopnosti proliferace a diferenciaci ke vzniku dvou progenitorových buněk – myeloidního progenitoru a lymfoidního progenitoru. Tyto progenitory se dále diferencují do jedné nebo více krevních řad za vzniku erytrocytů, trombocytů, granulocytů a monocytů, které vznikají z myeloidního progenitoru tzv. myelopoézou. Z lymfoidního progenitoru cestou lymfopoézy se další diferenciací vyvíjí T- a B- lymfocyty a NK-buňky (obr.1) (Pecka, 2002).

Obrázek 1: Schéma vývoje krevních buněk (převzato z Fellnerová *et* Bezdiček, 2014)



3.2.1. Lymfopoéza

Lymfocyty se tvoří z mateřských hematopoetických kmenových buněk, které dávají vznik lymfocytům, ale i jiným elementům, jež jsou součástí např. podpůrných tkání (Cooper, 1987). V primárních lymfoidních tkáních se z HSC v kostní dřeni vyvíjí B-lymfocyty nebo prothymocyty, které přestupují do thymu (brzlík) a dozrávají v T-lymfocyty. Následně oba typy lymfocytů přechází do krve a poté do sekundárních

lymfatických orgánů (lymfatické uzliny, slezina, lymfatické tkáně ve slezinách, tonzily) (Pecka, 2002).

3.2.2. Vývoj B-lymfocytu

B-lymfocyty jsou buňky, které se podílejí na správné funkci imunitního systému, jsou zodpovědné za specifickou imunitní odpověď. Imunitní systém je pozoruhodný pro svou schopnost reagovat s obrovským množstvím antigenů. Tato schopnost vychází z velké diverzity vytvářených protilátek, kterou zajišťuje jak jedinečné uspořádání genetické informace pro imunoglobuliny, tak genetické a somatické mutace.

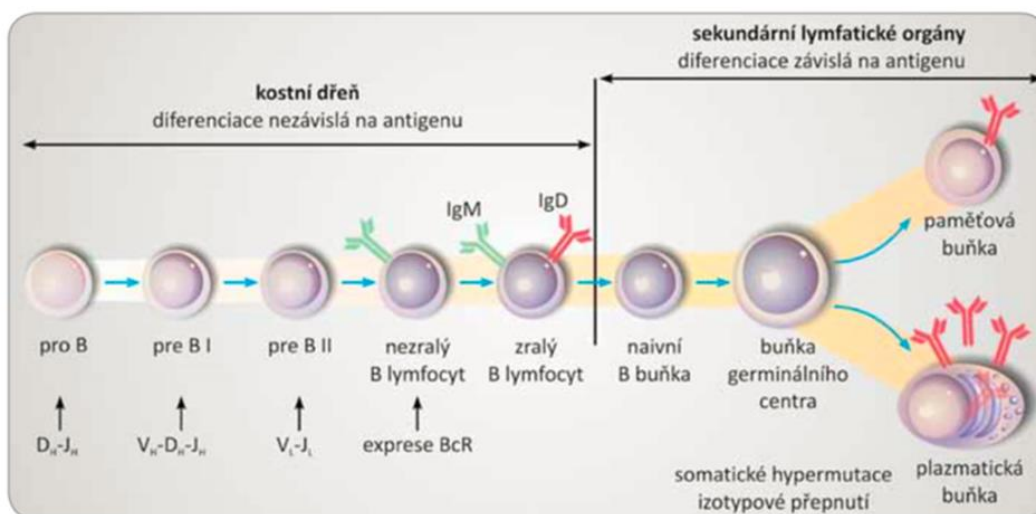
Vývoj B-lymfocytu začíná v kostní dřeni, kde tyto buňky procházejí několika stádii nezralých prekurzorů a postupně diferencují ve zralé, plně diferencované B-lymfocyty, které exprimují membránovou formu imunoglobulinu v podobě specifického B buněčného receptoru (BCR) (Cambier *et al.*, 2007).

V lidském genomu jsou tři geny pro imunoglobulinové řetězce. Gen *IgH* na chromosomu 14 (14q32) kódující těžký řetězec μ , *IgK* na chromosomu 2 (2p12) kódující lehký řetězec K a gen *IgL* na chromosomu 22 (22q11), který kóduje lehký řetězec λ . Vytrávání B-lymfocytu začíná ve stádiu pro-B-lymfocytu, kdy dochází k přeskupování genových segmentů – V(D)J rekombinací. Nejprve dochází k přeskupení segmentu D a J u těžkého řetězce a následuje druhý přesmyk, který připojuje V segment k již vzniklému komplexu DJ. Tato rekombinace je aktivována geny *RAG1* a *RAG2* (Recombination-activating gene). Funkční přeskupování genových segmentů z těžkého řetězce otevře vstup do další fáze, fáze pre-B-lymfocytu (Šmardová *et al.*, 2013, Piper *et al.*, 2013).

Ve stádiu pre-B-lymfocytu dochází k tvorbě pre-BcR, kde je lehký řetězec prozatím nahrazen řetězcem $\lambda 5$ a VpreB. V pre-B-lymfocytech dochází také k další expresi *RAG* genů, které zahájí V-J přesmyk u lehkých řetězců. Po uspořádání genů se tento řetězec přikládá k řetězci těžkému, spojí se pomocí disulfidických můstků a nekovalentních vazeb a vytvoří se buněčný receptor IgM a později IgD (Piper *et al.*, 2013; Mokrý, 1997). Buňky mající na svém povrchu exprimované IgM a IgD molekuly se označují jako nezralé B-lymfocyty, opouští kostní dřeň, jsou vyplavovány do krve a krví se dále dostávají do periferních lymfatických orgánů (Piper *et al.*, 2013). Nezralé B-lymfocyty vstupují do sleziny, kde osídlují primární lymfoidní folikuly (uzlina nebo tonzila) a začíná druhá fáze vývoje. Během této fáze se B-lymfocyty setkávají prostřednictvím folikulárních dendritických buněk (FCD – follicular dendritic cell) s antigeny a jsou pomocnými T-buňkami aktivovány. Po aktivaci B-lymfocyty intenzivně proliferují a tvoří germinální

centra (GC). V germinálních centrech dochází k somatickým hypermutacím (SHM - somatic hypermutation) ve variabilních oblastech imunoglobulinu procesem řízeným antigenem a také k izotypovému přepnutí (CSR – class-switch-recambination), během kterého dochází ke změně třídy imunoglobulinu z IgM a IgD na IgG, IgA a IgE (Šmardová *et al.*, 2013). Vývoj B-lymfocyty končí jejich diferenciací v efektorové plazmatické buňky (plazmocyty), které produkují a extracelulárně uvolňují velké množství imunoglobulinů stejné specifity. B-lymfocyty ale také mohou diferenciovat v paměťové buňky (Mokry, 1997).

Obrázek 2: Vývoj B-lymfocyty (převzato z Šmardová *et. al.*, 2013)



3.3. Cytogenetika a molekulární cytogenetika

Cytogenetika je vědní obor zabývající se studiem buněčných struktur nesoucích genetickou informaci chromosomů. Pomocí cytogenetických metod je umožněno studium struktury, vlastností, počtu chromosomů a také jejich chování v průběhu buněčného dělení somatických buněk, jejich růstu a vývoji (mitóza), ale také v průběhu dělení zárodečných buněk během reprodukce (meióza). Cytogenetika také umožňuje studium faktorů způsobujících chromosomové změny (Kannan *et Zilfalil*, 2009). Z počátku bylo velmi obtížné stanovit diploidní počet chromosomů, protože chromosomy se v metafázi těsnili k sobě. V roce 1950 došlo ke zlepšení techniky kultivace buněk a to přidáním kolchicinu, který ruší funkci dělicího vřeténka, a tak vyvolává nahromadění buněk ve stadiu metafáze. Dalším přínosem bylo v roce 1960 objevení fytohemaglutininu (extrakt z fazole, *Phaseolus vulgaris*) a jeho následným přidáním ke kulturám lymfocytů v krvi bylo zjištěno, že stimuluje buněčné dělení a zlepšuje jejich spiralizaci. Tyto nové objevy zlepšily techniku

analýzy lidských chromosomů a vedly k poznatkům, že analýza chromosomů je nezbytná ke studiu lidských nemocí (Kannan *et al.* Zilfalil, 2009; McNeil *et al.* Ried, 2000).

Do 70. let 20. století byly chromosomy rozlišovány pouze na základě velikosti a polohy centromér. Velký přínos přišel až s objevem pruhovacích technik, díky kterým mohly být jednotlivé chromosomy přesně charakterizovány. Objevitelem první techniky pruhování chromosomů byl Caspersen, který k barvení chromosomů používal fluorescenční deriváty quinakrinu a pro vyhodnocování fluorescenční mikroskop. Nicméně tato technika nebyla příliš optimální pro rutinní studie, a tak docházelo k vývoji nových pruhovacích technik, jako jsou G, R, C a NOR pruhování. V současné době se stala nejpoužívanější barvicí metoda pomocí G pruhování (G-banding). G pruhování využívá k denaturaci proteinů chromosomu trypsin a následně jsou chromosomy barveny Giemsovým barvivem. Tato metoda se stala nejpoužívanější díky faktu, že k vyhodnocení není zapotřebí fluorescenční mikroskop a také z možnosti přípravy trvalých preparátů (Rowley, 1973). Na základě pruhů, které jsou charakteristické pro každý chromosomový pár, se sestavuje karyotyp znázorňující celkový počet chromosomů (normální karyotyp ženy je 46, XX a muže 46, XY). Pomocí přesné analýzy těchto pruhovaných karyotypů byla sestavena současně mezinárodně platná cytogenetická nomenklatura a standardizace (ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature), kde každý chromosom je rozdělen na oblasti číslované směrem od centromery k telomerám. Standardizované zápisy početních a strukturních změn chromosomů umožňují rychlou orientaci v cytogenetických nálezech (Michalová *et al.* Zemanová, 2005). V nádorových buňkách nacházíme četné chromosomální změny. Mnohé z těchto změn jsou sekundární, vzniklé v důsledku genomové nestability v nádorové buňce. U jiných přestaveb může docházet ke změně pozice protoonkogenů nebo změně, která vyřadí z funkce alelu tumor supresorového genu. Tyto změny patří mezi změny primární a jsou příčinou maligního procesu. Většina změn, které nacházíme v nádorových buňkách, jsou klonální. Dle mezinárodně uznávané definice považujeme za klonální změnu nálezu dvou mitóz se stejnou odchylkou ve smyslu chromosomové přestavby (translokace, inverze, inzerce, amplifikace) nebo stejným nadpočetným chromosomem, nebo tří mitóz, ve kterých stejný chromosom chybí (Heim *et al.* Mitelman, 1987; ISCN, 1991).

Chromosomové abnormality se dělí na změny strukturní a změny numerické. Strukturní změny vznikají následkem chromosomových zlomů, které vyvozují ztráty segmentu, zdvojení segmentu nebo přestavby. Strukturní změna je považována za

balancovanou, pokud je stále přítomna kompletní sada chromosomů a nebalancovanou v případě, že část genetického materiálu chybí či přebývá. Nebalancované změny zahrnují delecce, duplikace, inserce, izochromosomy nebo kruhové (ring) chromosomy. Při delecí dochází ke ztrátě části chromosomu a to tak, že může dojít buďto k jednomu zlomu, v tomto případě se jedná o terminální delecí, dojde-li ke dvěma zlomům, tak se jedná o delecí intersticiální. Ke vzniku inserce jsou nezbytné zlomy nejméně tři a zasažen může být jeden nebo dva chromosomy (Michalová, 1999). Při vzniku izochromosomu dojde k delecí jednoho raménka chromosomu a druhé je duplikováno.

Balancované přestavby zahrnují aberace, jako jsou translokace a inverze. Při translokaci dochází ke vzájemné výměně dvou nebo více částí nehomologních chromosomů. Vymění-li segment z jednoho chromosomu se segmentem chromosomu druhého, jedná se o reciprokovou translokaci (Griffiths *et al.*, 2000). Druhým možným typem translokace je translokace robertsonovská, která vzniká mezi dvěma akrocentrickými chromosomy. Při tomto typu translokace se chromosom láme v místě centromery, krátká ramena se ztrácí a dochází k centrické fúzi obou chromosomů (Michalová, 1999). Další typ strukturní chromosomové změny představuje inverze. Při inverzi dochází ke dvěma zlomům na témže chromosomu, přetočení segmentu mezi zlomy a následnému spojení s distálními segmenty (Griffiths *et al.*, 2000). Inverze může být dvojího typu, pericentrická, při které se mění poloha centromery a paracentrická, která nemusí měnit poměr ramen a polohu centromery ((Michalová, 1999). Pokud ovšem ve vzorku dojde k nalezení více jak tří chromosomových abnormalit, jedná se o komplexní karyotyp.

Nicméně existuje mnoho chromosomových abnormalit, které nejsou metodami klasické cytogenetiky detekovatelné. Na překonání těchto omezení byly zavedeny v roce 1980 nové metody, metody molekulární cytogenetiky. Základní metoda řadící se do této kategorie je fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Dále se z této techniky vyvíjí další metody, založené na stejném principu a hlavním velkým přínosem bylo zavedení metody mnohobarevné FISH (m-FISH) (Liehr *et al.*, 2004).

3.3.1. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a metoda mnohobarevné FISH (mFISH)

Metoda FISH zahrnuje použití fluorescenčně značené DNA sondy, které hybridizují ke genomové DNA sekvenci a umožňují studium specifického místa na chromosomu. Z počátku bylo pro značení DNA sond používáno radioaktivních izotopů, nicméně použití fluorochromů je bezpečnější, vyžaduje kratší reakční čas a značení může být vícebarevné (McNeil *et* Ried, 2000). Metoda FISH umožňuje studium celého genomu ale i specifických genomových oblastí jak v metafázi, tak i v interfázi. Tato metoda je využívána k určování početních a strukturních chromosomových odchylek, určení zda se jedná o maligní proces, klonální evoluci nebo benigní proliferaci a také určení chromosomového vybavení jader v interfázi. Princip metody spočívá v zahřívání dvoušroubovicové molekuly DNA, dochází k zániku vodíkových můstků a rozvolnění dvoušroubovice. Za snižující se teploty může dojít ke zpětnému navázání dvoušroubovice DNA. Je-li komplementárním vláknem specificky značená DNA sonda, dojde k jejímu navázání na specifickou oblast chromosomu a následné vizualizaci této oblasti pomocí fluorescenčního mikroskopu (Michalová, 1999).

DNA sondy jsou v rámci klinické praxe rozděleny do 3 základních kategorií. Jedná se o sondy genově specifické, které značí specifické sekvence v cílové DNA. Sondy opakujících se sekvencí (repetitivních sekvencí) zahrnující centomerické sondy, které se uplatňují při identifikaci markerů a chromosomových numerických abnormalit a telomerové sondy. Poslední skupinou jsou celochromosomové sondy, kdy je fluorescenčně značen celý chromosom (McNeil *et* Ried, 2000).

Z metody FISH se dále vyvíjely další molekulárně cytogenetické metody a jednou z nich je metoda mnohobarevné (multicolor) FISH (mFISH). Metoda mFISH využívá celochromosomových sond a jejím principem je kombinační značení jednotlivých celochromosomových sond rozdílnými fluorochromy. Kombinací podle vzorce $2^N - 1$, kde N je počet fluorochromů, lze kombinací 5 fluorochromů určit všech 24 chromosomů v jediné hybridizační reakci. Nabarvené chromosomy jsou hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu a pomocí vytvořeného digitálního obrazu je každá z kombinací barev analyzována pomocí softwarového programu, který dané kombinaci barev přiřadí pseudobarvu (Kearney, 2005). V jedné hybridizační reakci lze během 24 hodin obarvit a vyhodnotit všech 22 autozomů a chromosomy X a Y, tedy celý genom. Metoda mFISH se používá především pro určení komplexních karyotypů (až 30% nemocných s leukémiemi a lymfomy) a komplexních strukturních přestaveb (Kannan *et* Zilfalil, 2009).

3.4. Nehodgkinské lymfomy (NHL)

Nehodgkinské lymfomy (NHL) představují pátý nejčastější zhoubný nádor západní polokoule. V České republice je každoročně diagnostikováno kolem 15 nových pacientů na 100 000 obyvatel a tento počet se každoročně zvyšuje o 3-4 % (Pytlík, 2013). Jedná se o heterogenní skupinu nádorů různého buněčného původu, odlišné morfologie, genetického profilu a klinických charakteristik. NHL vznikají nádorovou transformací a následnou klonální expanzí B- nebo T- lymfocytů, vzácně i NK-buněk (asi 85 % kategorií NHL vznikají transformací B-lymfocytů a ostatní typy jsou odvozeny od T-lymfocytů a NK-buněk). Jedná se tedy o maligní nádory buněk imunitního systému (Indrák, 2006/2007).

NHL může vzniknout ve spojení s chronickými zánětlivými procesy (*Helicobacter pylori*, chlamidie), v souvislosti s imunosupresí (vrozené a získané poruchy imunity), s virovou infekcí (HIV, EBV) nebo také s dědičnou zátěží. Příbuzní první linie mají 2-3krát větší riziko vzniku lymfomu (Sýrová *et al.*, 2010).

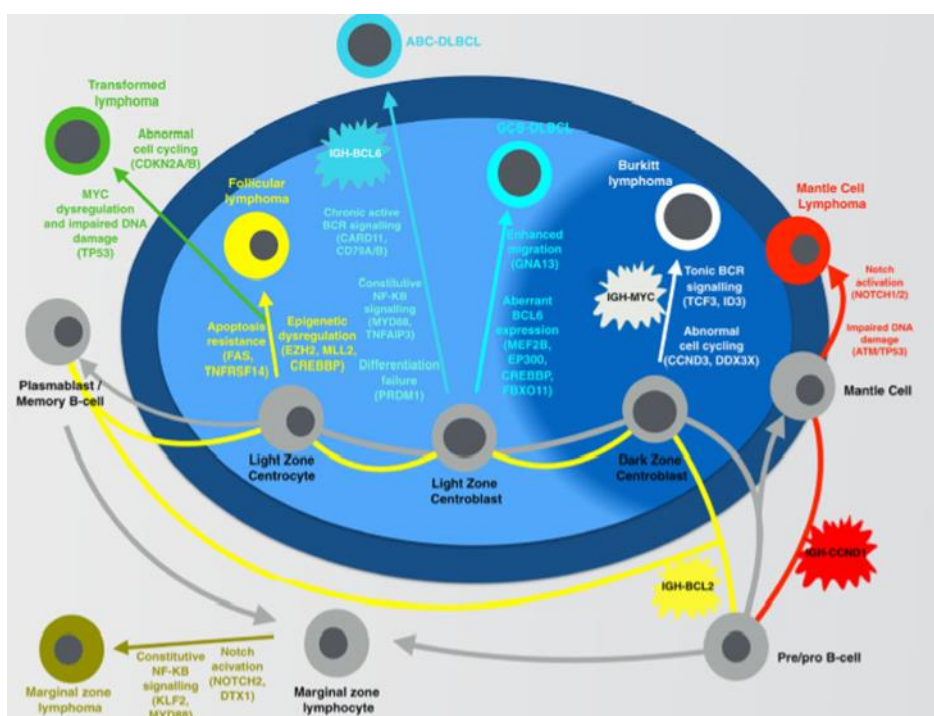
3.4.1. Patogeneze

Proces lymfomogeneze je vícestupňový proces, během kterého dochází k akumulaci genetických změn, které buňkám poskytují selekční růstovou výhodu. Nejprve dochází k primárním genetickým změnám v určitém lymfatickém prekurzoru. V průběhu jednotlivých kroků diferenciaci B-buněk dochází ke kumulaci dalších změn, které jsou často prvním krokem maligní transformace (obr.č.3). Díky probíhajícím somatickým mutacím v genech pro těžké řetězce imunoglobulinů nebo v genech pro T-buněčné receptory dochází k tvorbě klonu, který dále expanduje a akumuluje další somatické mutace, vedoucí k agresivnějšímu chování klonu. Sekundární genetické změny postihují některé důležité onkogeny nebo nádorové supresory (TSG). Tyto onkogeny a TSG se podílejí na regulaci proliferace, přežívání nebo diferenciaci buněk, buňka následně mění své chování a transformuje v buňku maligní (Blombery *at al.*, 2015). Sekundární změny přispívají k nestabilitě genomu a podílejí se na progresi lymfomu a také ovlivňují prognózu (Bea & Campo, 2008).

Příkladem primární změny v lymfomogenezi je translokace t(14;18)(q32;q21), ke které dochází v průběhu raného vývoje B-lymfocytu, pravděpodobně v průběhu přestaveb imunoglobulinových genů (tzv. V(D)J rekombinace). Translokace vede k přemístění genu *BCL2* z chromosomu 18q21 pod kontrolu zesilovače transkripce genů těžkého řetězce imunoglobulinu (IgH) na chromosomu 14q32, což ve svém důsledku vede k nadměrné expresi *BCL2* genu.

Příkladem sekundárních změny je delece nebo mutace *TP53* genu. Gen *TP53* se nachází na krátkých ramenech chromosomu 17 v pruhu p13. Inaktivace v důsledku mutace či delece jedné nebo obou alel genu umožňuje nádorové buňce procházet buněčným cyklem i přes poškozenou DNA. V důsledku toho dochází ke zvýšené nestabilitě a progresi nádorového klonu v agresivnější formu lymfomu (Indrák, 2006/2007).

Obrázek 3: Přehled onkogeneze vedoucí k B - buněčným ne Hodgkinským lymfomům (převzato z Blombery *at al.*, 2015)



3.4.2. Diagnostika

Diagnosa NHL je stanovena na základě biopsie a histopatologie reprezentativní tkáně. Pro určení specifického podtypu NHL jsou používány dále metody imunohistochemické, imunofenotypizační, cytogenetické a molekulárně genetické, které jsou doplněny klinickými nálezy.

Klinické stádium, ve kterém se pacienti při diagnose NHL nachází, se stanovuje dle rozsahu onemocnění na základě diagnostických vyšetření podle Ann Arbor klasifikace (Tabulka 1).

Tabulka 1: Ann Arbor klasifikace NHL (Sýrová et. al., 2010)

Stadium	Postižení
Stadium I	postižení 1 oblasti LU nebo 1 oblasti extralymfatického orgánu
Stadium II	postižení 2 nebo více skupin LU na téže straně bránice nebo lokalizované postižení 1 extralymfatického orgánu, včetně postižení 1 nebo více skupin LU na téže straně bránice
Stadium III	postižení LU nebo lymfatických orgánů na obou stranách bránice, které může být provázeno lokalizovaným postižením 1 extralymfatického orgánu nebo tkáně, sleziny nebo obojího
Stadium IV	difúzní nebo diseminované postižení 1 nebo více extralymfatických orgánů či tkání s nebo bez současného postižení LU

Legenda: LU – lymfatické uzliny

Přesné určení rozsahu choroby je nezbytné pro správné stanovení léčby každého pacienta. K základním vyšetřením patří analýza krevního obrazu, histologické vyšetření kostní dřeně a CT hrudníku, břicha a malé pánve. Před léčbou jsou také prováděna doplňková vyšetření základních orgánů (EKG, echokardiografie, spirometrie, vyšetření štítné žlázy). Další vyšetření se provádí na základě klinické situace (Pytlík, 2013).

Pro NHL je charakteristické odlišné biologické i klinické chování a na tomto základě lze rozdělit NHL na indolentní a agresivní. Agresivní lymfomy, mezi které patří například difúzní B velkobuněčný lymfom (DLBCL), lymfom plášťové zóny – mantle cell lymphoma (MCL), Burkittův lymfom (BL) rychle rostou a šíří se, naopak indolentní typy, jako folikulární lymfom (FL) nebo lymfom marginální zóny (MZL), se vyznačují pomalejším průběhem nemoci.

3.4.3. Léčba

Způsob léčby se odvíjí od stanovení přesné diagnózy a následná léčba je stanovena podle typu NHL dle biologického a klinického chování. Při terapii indolentních lymfomů se u počátečních stádií indukuje cílená radioterapie. Při pokročilejším stupni onemocnění se volí kombinovaná chemoterapie pomocí COP (cyklofosfamid, vincristin, prednison) a u agresivnějších forem s horší prognózou se obvykle zařazuje i CHOP (cyklofosfamid, adriablastin, vincristin, prednison). Chemoterapie CHOP se užívána již od 70. let, nicméně v poslední době je doplněna zařazením protilátky proti antigenu CD20 (anti-CD20 – Rituximab). Při terapii agresivních lymfomů s lokalizovanou chorobou a příznivými prognostickými rysy je indukována polychemoterapie (Pytlík, 2013).

3.5. Klasifikace NHL

Současná klasifikace lymfomů vychází z posledního vydání klasifikace hematologických malignit světové zdravotnické organizace (WHO z angl. World Health Organisation) z roku 2016. WHO klasifikace zahrnuje velké množství jednotek definovaných na základě kombinace morfologických, imunologických, molekulárně biologických a klinických znaků. Základní rozdělení B-buněčných malignit je uvedeno v tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Zjednodušená klasifikace WHO B-buněčných malignit

B-lymfoidní malignity
Prekurzorové
<ul style="list-style-type: none">• B-akutní lymfoblastová leukemie/lymfom
Periférní
<ul style="list-style-type: none">• Chronická lymfocitární leukemie/lymfom z malých lymfocytů (CLL/SLL)• Splenický B-lymfom z marginálních buněk• Vlasatobuněčná leukémie• Lymfoplazmocytový lymfom• Plazmocelulární myelom• Extranodální lymfom z buněk marginální zóny typu MALT• Nodální lymfom z buněk marginální zóny• Folikulární lymfom• Lymfom z buněk pláště• Difuzní velkobuněčný B-lymfom• Primární mediastinální velkobuněčný lymfom• Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom• Burkittův lymfom• Neklasifikovatelný B-lymfom, se znaky mezi DLBCL a Burkittovým lymfomem• Neklasifikovatelný B-lymfom, se znaky mezi DLBCL a Hodgkinovým lymfomem

3.5.1. Folikulární lymfom (FL)

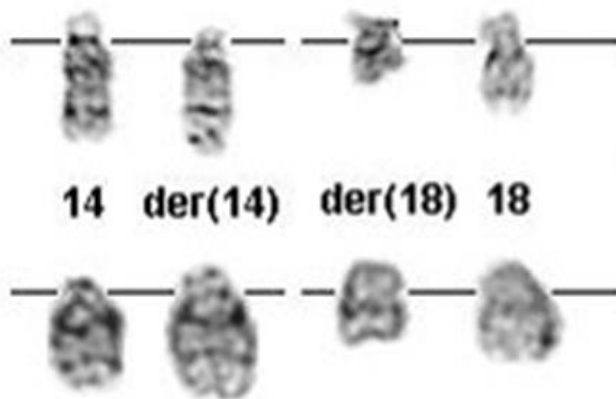
Folikulární lymfom tvoří přibližně 20 % všech maligních lymfomů (Nogai *et al.*, 2011). Klinický průběh FL může být velmi variabilní s celkovým přežitím více než 20 let. FL je odvozen z B-lymfocytu germinálního centra (GCB), jedná se o skupinu středně velkých lymfocytů (centrocyty a centroblasty) postihující folikuly uzliny. Dle histologie se FL dělí na dva stupně - stupeň 1 (malé buňky, nebo smíšené malé a velké buňky) a stupeň 2 (převážně velké folikulární buňky) (Indrák, 2006-2007).

Primární chromosomovou změnou, vyskytující se u 80-90 % případů FL, je translokace $t(14;18)(q32;q21)$ (Obrázek 4). Translokace vede k přemístění genu *BCL2* z chromosomu 18q21 na chromosom 14q32, pod kontrolu zesilovače transkripce těžkého řetězce imunoglobulinového genu (*IgH*). V důsledku této translokace je gen *BCL2* nadměrně exprimován. Protein Bcl2 funguje jako blokátor apoptózy (programované buněčné smrti). Přítomnost D oblasti genu *IgH* na derivovaném chromosomu 18 a oblasti J oblasti na derivovaném chromosomu 14 u $t(14;18)(q32;q21)$ vede k předpokladu, že ke zlomu dochází v průběhu „přesmyku imunoglobulinových genů“ při normální ontogenezi (Blombery *et al.*, 2015). V 50 – 70 % případů $t(14;18)(q32;q21)$ dochází ke zlomu *BCL2* v oblasti označené MBR – major breakpoint region. Ve zbytku případů dochází ke zlomu v přechodném bodě (ICR – intermediate cluster region) nebo v oblasti mcr (minor cluster region). Translokace $t(14;18)(q32;q21)$ je pozorována také u cca 20% difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL), přesněji u jeho podtypu GCB-DLBCL (Nogai *et al.*, 2011; Blombery *et al.*, 2015). Přestože je translokace primární změnou, samotná změna není pro vznik lymfomu dostatečná. Ke vzniku nádoru jsou zapotřebí další genetické nebo epigenetické změny (Indrák, 2006/2007).

Jako variantní translokace byly vzácně popsány $t(2;18)(p12;q21)$ a $t(18;22)(q21;q11)$ (Compagno *et al.*, 2009). Pouze 20 % nemocných s FL má $t(14;18)$ jako jedinou změnu karyotypu, ostatní mají v době diagnostiky další sekundární chromosomové změny. Nejčastější sekundární změnou jsou trisomie chromosomů 7, 12 nebo 12q a 18 nebo 18q, duplikace derivovaného chromosomu 18, $der(18) t(14;18)$ a přítomnost nadpočetného chromosomu X. K častým sekundárním změnám patří i změny strukturní, zahrnující chromosomy 1, 6q a 10q22q24, nebo přestavba genu *BCL6* (3q27) vyskytující se u 9-14 % případů (Schmidlin *et al.*, 2008). U 60-80 % pacientů s FL může dojít k jeho transformaci do agresivního DLBCL. Progrese je obvykle spojena s akumulací sekundárních genetických změn. Molekulární analýzy identifikovaly u 73 % případů s FL

deleci 9p, což naznačuje že, del(9p) by mohla být důležitou sekundární událostí v histologické progresi FL (Elenitoba-Johnson *et al.*, 1998).

Obrázek 4: Parciální karyotyp translokace t(14;18)(q32;q21) u FL



Převzato a upraveno z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1418ID2006.html>

3.5.2. Difúzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL)

Difúzní velkobuněčný B lymfom představuje nejčastější typ maligního lymfomu a zahrnuje přibližně 30-40 % všech případů lymfomů dospělého věku (Nogai *et al.*, 2011). DLBCL je agresivní onemocnění, které vzniká buď *de novo*, nebo se může vyvinout z méně agresivních typů lymfomů, jako je chronická lymfocytární leukemie (CLL)/lymfom z malých lymfocytů (SLL) a FL. DLBCL je lymfom s vysokou klinickou i biologickou heterogenitou (Chastain *et Duncavage*, 2015). Na základě čipových analýz genové exprese (GEP – gene expression profiling) se ukázalo, že rozdílná genová exprese může subklasifikovat nemocné do prognostických podskupin (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenvald *et al.*, 2003). Na základě expresních profilů může být DLBCL klasifikován do tří molekulárních podtypů, které jsou označovány jako GCB DLBCL (vychází z germinálního centra), ABC DLBCL (vychází z aktivovaných B-buněk) a primární mediastinální B lymfom (PMBL) (Alizadeh *et al.*, 2000). GEP těchto podtypů naznačuje, že jednotlivé typy vznikají v různých fázích diferenciaci B-lymfocytu. GCB DLBCL jsou odvozeny z lymfocytů ze zárodečných (germinálních) center B-lymfocytů, protože se vyznačují expresí genů charakteristických pro normální B-buňky germinálních center. Podskupina ABC DLBCL exprimuje geny charakteristické pro *in vitro* aktivované periferní

B-lymfocyty (Rosenwald *et al.*, 2002). Třetím typem DLBCL je PMBL, který se objevuje typicky u mladých žen s průměrným věkem 30-35 let a dnes je považován za samostatnou podskupinu NHL. Na základě GEP se ukazuje, že PMBL vychází z B-buněčných subpopulací, které jsou umístěny v brzlíku. Zajímavý je podstatný překryv unikátního profilu genové exprese tohoto PMBL s buněčnými liniemi Hodgkinova lymfomu, což naznačuje, že tyto dvě onemocnění spolu sdílí určité biologické vlastnosti (Rosenwald *et al.*, 2002; Savage *et al.*, 2003).

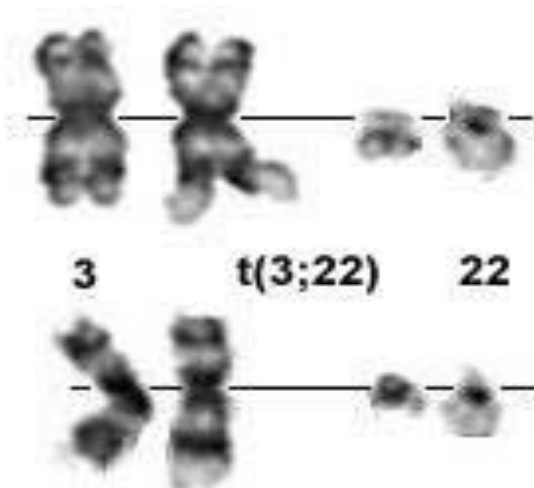
Mezi nejčastější chromosomové změny patří translokace postihující imunoglobulinové geny: *IgH* (14q32), *IgL* (22q11) a *IgK* (2p12), které byly prokázány přibližně u poloviny případů DLBCL. Tyto změny zahrnují translokace t(14;18)(q32;q21), t(8;14)(q24;q32) nebo t(8;22)(q24;q11), t(3;14)(q27;q32), t(3,22)(q27;q32) a další změny zahrnující oblast 14q32 (Campbell *et al.*, 2005).

U 20 % případů DLBCL byla popsána translokace t(14;18)(q32;q21) (viz výše odstavec FL). Nicméně tato translokace je typická pro FL, takže se předpokládá, že přestavba genu *BCL2* u DLBCL může znamenat transformaci z FL, ale může představovat i *de novo* proces. Tato změna byla prokázána u 45 % případů spadajících pravděpodobně do podtypu GCB DLBCL, u ABC DLBCL detekována nebyla (Nogai *et al.*, 2011). ABC DLBCL se naopak vyznačuje přestavbou genu *BCL6* (3q27) (obr. 5), která se vyskytuje přibližně u 25-57 % případů nemocných s DLBCL (Iqbal *et al.*, 2007; Tibiletti *et al.*, 2009).

Bea *et al.* v roce 2005 popsali nejčastěji zmnoženou oblast u GCB podskupiny, a to oblast chromosomu 12q12. Nadpočetné kopie byly prokázány až u 21 % pacientů s GCB DLBCL, v porovnání s podskupinami ABC a PMBL, kde byla frekvence výskytu pouze kolem 5 %.

Další velmi často se opakující cytogenetickou změnou u pacientů s DLBCL je zmnožení oblasti 2p14-p16. U nemocných stratifikovaných do prognostické podskupiny GCB DLBCL byla tato aberace prokázána až u 17 % případů. V porovnání s podskupinou PMBL kde je frekvence zmnožení až v 47 %, je nutné zmínit, že duplikace této oblasti je spíše charakteristickým markerem pro stratifikaci pacientů do podskupiny primárního mediastinálního B lymfomu, ačkoli se jedná o jednu z nejfrekventovanějších aberací u GCB DLBCL (Bea *et al.*, 2005).

Obrázek 5: Parciální karyotyp translokace t(3;22)(q27;q11) u ABC DLBCL



Převzato z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/3q27ID2081.html>

Další změna, která je detekovatelná u DLBCL, je přestavba genu *MYC* (8q24). Tato změna je charakteristická pro Burkittův lymfom (BL), ale byla popsána i u 2-10 % případů DLBCL. Přestavba genu *MYC* je spojena s horší prognózou (Kramer *et al.*, 1998; Vitalo *et al.*, 1998).

Opakující se změnou detekovanou u 11 % pacientů s diagnosou GCB DLBCL je delece tumor supresorového genu *PTEN* (10q23.3) (Lenz *et al.*, 2008). Ve stejné frekvenci výskytu bývá prokázána amplifikace mikroRNA, miR17-92 na dlouhých ramenech chromosomu 13, která se podílí na potlačení fyziologické funkce genu *PTEN*. Obě uvedené aberace jsou spojovány s prognostickou podskupinou GCB. Tyto změny nikdy nebyly prokázány u subtypu ABC DLBCL nebo PMBL (Lenz *et al.*, 2008)

Nejčastěji identifikovanou změnou, detekovanou až u 57 % pacientů s DLBCL je translokace zahrnující gen *BCL6* (3q27) (Tibiletti *et al.*, 2009). *BCL6* je protoonkogen kódující transkripční represor exprimovaný výhradně během diferenciaci B buněk v germinálním centru (GC), kde se účastní samotné tvorby GC. Naopak jeho snížená exprese je nutná k terminální diferenciaci B buněk do paměťových nebo plazmatických buněk. Zároveň *BCL6* potlačuje aktivitu nádorového supresorového genu *TP53* navozujícího apoptotickou smrt buněk. V případě deregulace genu *BCL6* u pacientů s DLBCL dochází k neomezené expresi tohoto genu a zamezení programované buněčné smrti v důsledku poškození DNA během somatické hypermutace. Nejčastěji byla u pacientů s DLBCL prokázána translokace t(3;14)(q27;q32). Translokačním partnerem však nemusí být pouze geny pro těžké řetězce imunoglobulinů (*IGH/14q32*). Byly popsány další dvě variantní translokace a identifikováno více než 20 nonIG translokačních partnerů zapojených do

signálních drah, kontroly buněčného cyklu a genomické stability. Nejčastější lokusy vstupující do translokace byly prokázány na chromosomech 3 (3q25, 3q26.33, 3q27.3, 3q29), 6 (6p21, 6q21.1, 6q15) a 12 (12p13.31, 12q12.1, 12q23-q24.1) (Jardin *et al.*, 2007). Pacienti, u nichž byla nalezena přestavba genu *BCL6* spojená s translokací genů pro imunoglobulin těžkých nebo lehkých řetězců, měli lepší prognózu onemocnění, než pacienti s translokací genů typu nonIG (Akasaka *et al.*, 2000). Příkladem horší prognózy nonIG reciproké translokace genu *BCL6* je t(1;3)(p34;q27), která je spojena s vysokou proliferativní aktivitou nádorových buněk. Bližší analýza zatím neznámého genu v lokusu 1q34 zapojeného do translokace je předmětem další studie, která by měla objasnit jeho úlohu během lymfomogeneze (Niitsu *et al.*, 2008). Přestavba genu *BCL6* nebo jeho početní změny jsou rutinně prokazovány pomocí metody FISH na interfázních jádrech nebo metafázních chromosomech.

Další velmi často se vyskytující aberací je zmnožení oblasti 18q21-q22 zahrnující gen *BCL2* (18q21). V důsledku duplikace/amplifikace dlouhých ramen chromosomu 18 dochází k deregulaci exprese genů, které jsou lokalizovány v oblasti 18q. Mezi dva nejčastěji upregulované geny patří *BCL2* (18q21) a *NFATC1* (18q23). Pro ABC DLBCL je typická vysoká úroveň exprese *BCL2* v důsledku zmnožení lokusu 18q21, které poukazuje na alternativní mechanismus upregulace genu. Nadměrná exprese *BCL2* je spojena se špatnou prognózou u pacientů v podskupině ABC, ale ne u subtypu GCB DLBC (Iqbal *et al.*, 2011).

Prognostická podskupina ABC DLBCL je odvozena z B buněk, které se diferencují a přechází do stádia plazmatické buňky. Správný průběh diferenciací řídí gen *PRDM1* (6q21), transkripční represor, jehož delece nebo inaktivující mutace byla pozorována až u 40 % pacientů s ABC DLBCL. Mimo gen *PRDM1* je do patogeneze zapojeno více genů lokalizovaných na dlouhých ramenech chromosomu 6. Minimální oblast ztráty byla vymezena v rozsahu 6q21q22 a 6q25qter. Thelander *et al.* (2008) uvádí u DLBCL dvě oblasti minimální delece, a to 6q14.1q24.1 a 6q23.3qter. Proximální delece 6q byla pozorována spíše u pacientů po transformaci, zatímco distální delece je spojována s *de novo* DLBCL.

Až u 18 % všech pacientů s diagnosou ABC DLBCL bývá prokázána delece tumor supresorového genu *TP53* (17p13). Inaktivace *TP53* vede k nekontrolovatelné buněčné proliferaci a následně k nestabilitě nádorového genomu. Mutace a/nebo delece *TP53* snižuje celkové přežití u všech pacientů s DLBCL (Stefancikova *et al.*, 2011).

3.5.3. Lymfom z pláštěvých buněk (Mantle cell lymphoma - MCL)

Lymfom z pláštěvých buněk (MCL) tvoří 5-10 % všech případů lymfomů u dospělých osob (Nogai *et al.*, 2011). Jedná se o agresivní lymfom, který je odvozen od naivních B-buněk nacházejících se v primárních folikulech nebo v pláštěvých zónách sekundárních folikulů.

MCL je charakterizován chromosomální translokací t(11;14)(q13;q32) (Obrázek 6), která je přítomna ve většině případů (Leroux *et al.*, 1991). V důsledku translokace dochází k přemístění genu pro cyklin D1 (*CCND1*) na chromosomu 11 pod zesilovač transkripce genů *IgH* na chromosom 14. Translokace (11;14)(q13;q32) se nachází v 95-99 % případů lymfomů z pláštěvých buněk (MCL – mantle cell lymphoma). V důsledku této změny dochází k nadměrné expresi cyklinu D1 (gen *CCND1*). Cyklin D1 tvoří komplex s cyklin-dependentní kinázou CDK4 a CDK6 a hraje důležitou roli v buněčném cyklu, kde působí jako regulační jednotka při přechodu z G1 fáze do S fáze (Sherr *et McCormick*, 2002). Tento komplex fosforyluje a inaktivuje tumor supresorový retinoblastomový protein (Rb). Retinoblastomový protein hraje významnou roli v regulaci transkripčních faktorů a díky této funkci je schopen tlumit buněčné dělení a tedy i rakovinné bujení. Stejně důležitou roli hraje cyklin D1/CDK4/6 komplex vážící p27kip1 inhibující cyklin E/CDK2 komplex. Toto odloučení p27kip1 umožňuje komplexu cyklin E/CDK2 vstup do S-fáze prostřednictvím fosforylace Rb (Sherr *et McCormick*, 2002).

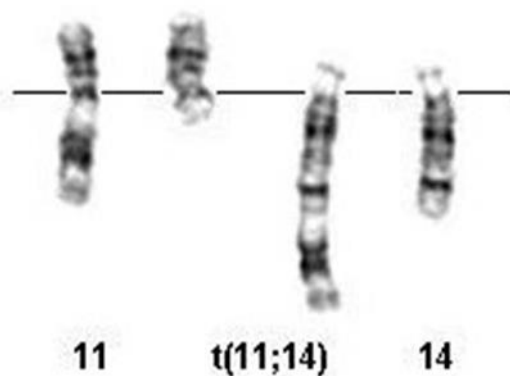
Detailnější cytogenetické studie také prokázaly, že MCL je lymfom s největším počtem přidatných chromosomových abnormalit, které postihují regulaci buněčného cyklu a iniciují další progresi nádoru (Papajík *et al.*, 2007). Pomocí analýzy genové exprese (GEP) byly prokázány případy MCL, které postrádají cyklin D1 mRNA expresi. Tyto cyklin D1 negativní MCL vykazovaly charakteristické morfologické, imunohistochemické a klinické příznaky cyklin D1 pozitivní MCL (Geske *et al.*, 2006). U případů cyklin D1 negativní byla prokázána přítomnost cyklinu D2 nebo D3, což naznačuje, že tyto cykliny mohou funkčně nahradit cyklin D1 u MCL (Fu *et al.*, 2005).

Další genetickou změnou ovlivňující regulaci buněčného cyklu jsou homozygotní delece zahrnující *p16^{INK4a}* a *p14^{ARF}* ležící na chromosomu 9 (9p21). Tyto změny byly popsány u značného podílu agresivních případů MCL (Pinyol *et al.*, 1997). Protein *p16^{INK4a}* inhibuje interakci mezi CDK4, CDK 6 a cyklinu D1 a tím kontrolu fosforylace a inaktivace Rb (Rosenwald *et al.*, 2003). U některých případů s MCL dochází k amplifikaci nebo nadměrné expresi BMI1, který působí jako transkripční represor *p16^{INK4a}* (Bea *et al.*,

2001). Dále bylo zjištěno, že u pacientů s vysoce agresivní MCL dochází k amplifikaci a nadměrné expresi CDK4 (Hernandez *et al.*, 2005).

Dalším patogenetickým znakem vyskytujícím se u agresivních případů MCL je deregulace buněčné odpovědi na poškozenou DNA, což je dokázáno výskytem chromosomových změn a tetraploidních karyotypů (Ott *et al.*, 1997). K dalším změnám vyskytujícím se u případů MCL patří mutace a delece genu *ATM* (ataxia-telangiectasia mutated), který hraje důležitou roli v buněčné odpovědi na poškozenou DNA (Schaffner *et al.*, 2000). Přibližně u 15 % případů MCL byly zjištěny delece *TP53*, které jsou spojovány se špatnou prognózou (Greiner *et al.*, 1996).

Obrázek 6: Parciální karyotyp translokace t(11;14)(q13;q32) u MCL



Převzato a upraveno z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1114ID2021.html>

3.5.4. Lymfom marginální zóny (MZL)

V současné době jsou popsány tři různé klinicko-patologické formy marginální zóny B-buněčného lymfomu (MZBCL): extranodální, vyvíjí se například v gastrointersticiálním traktu, kůži a je označován jako (MALT), splenický MZBCL (jinak také známý jako slezinový lymfom z vilózních lymfocytů) a lymfom vyvíjející se primárně v lymfatických uzlinách je označován jako nodální MZL. Všechny tyto tři podtypy vykazují odlišné nálezy chromosomových abnormalit (Campbell *et al.*, 2005).

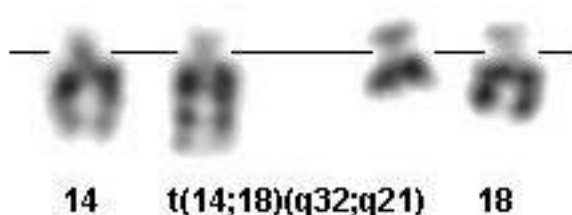
Pro MALT lymfom jsou charakteristické trisomie chromosomů 3, 12 nebo 18 a série reciprokových translokací. U 30-50 % MALT lymfomu je popsána translokace t(11;18)(q21;q21), ale tato změna není přítomná u splenického a uzlinového lymfomu.

Geny zapojené do této translokace jsou apoptotické inhibitory genu *API2* (11q21) a genu *MALT1* (18q21), který tvoří hybridní gen *API2/MALT1* na derivovaném chromosomu 11

(Campbell *et al.*, 2005). Další translokací, které se může gen *MALTI* účastnit je translokace t(14;18)(q32;q21) (Obrázek 7). Tato změna má shodný výsledek v rámci konvenční cytogenetiky s translokací t(14;18)(q32;q21) typickou pro FL, nicméně při translokaci u MALT lymfomu dochází k fúzi genů *IgH* a *MALTI* spíše než s genem *BCL2*, který leží v jeho těsné blízkosti (Streubel *et al.*, 2003). Další méně častou translokací popsanou u MALT lymfomu je t(1;14)(p22;q32), při které dochází k přemístění genu *BCL10* z chromosomu 1 pod zesilovač transkripce genu *IgH* na chromosomu 14.

Nejběžnější cytogenetické změny popsané u lymfomu sleziny jsou delece 7q a 17p (genu *TP53*) a trisomie chromosomů 3 a 12. Alelické ztráty 7q byly prokázány přibližně u 40 % případů. U lymfomu uzlin MZBCL byla pozorována opakující se trisomie chromosomu 3, nicméně tato změna je nejčastější početní změnou objevující se u jiných lymfoproliferativních onemocnění a tak nemůže být považována za specifickou pro tento typ lymfomu (Campbell *et al.*, 2005).

Obrázek 7: Parciální karyotyp t(14;18)(q32;q21) u MZL



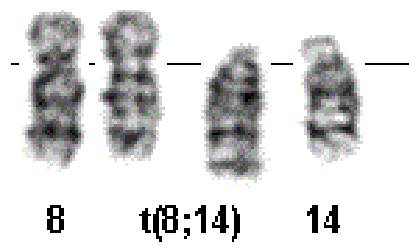
Převzato a upraveno z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1418q32q21ID1350.html>

3.5.5. Burkittův lymfom (BL)

Burkittův lymfom je agresivní typ nádoru vyskytující se nejčastěji u dětí v oblastech s holoendemickou a hyperendemickou malárií, ale také v menší míře ve všech ostatních částech světa (God *et* Haque, 2010). První pozorování bylo popsáno v roce 1958 a provedl ho na 38 dětech afrického původu Dennis Burkitt (Burkitt, 1958). BL je rozdělen na základě epidemiologických pozorování na: endemický BL (eBL) a sporadický BL (sBL). Kromě geografického rozdělení se tyto subtypy eBL a sBL liší podle své asociace s infekcí Epstein-Barr virem (EBV). EBV infekce byla původně objevena u eBL a je prakticky přítomna u všech eBL. U nemocných s BL je přítomna pouze v 10-20%. Tento typ BL se běžně vyskytuje v rovníkové Africe a Papuy-Nové Guinei, kde je velmi

rozšířená nemoc malárie, která pravděpodobně podporuje transformační schopnost EBV infekce (Bornkamm, 2009). Po celém světě je v určitém okamžiku svého života nakaženo virem EBV více než 90 % lidí. Ačkoli většina infikovaných jedinců zůstává zdravá, EBV může vést k patologickým stavům spojeným s řadou různých lidských onemocnění a malignit. EBV má rovněž schopnost transformovat normální B-lymfocyty do neustále rostoucích a nesmrtelných buněk vedoucích ke vzniku BL a B-lymfoblastických buněk (Williams *et Crawford*, 2006; Pietersma *et al.*, 2008). S objevem viru HIV (human immunodeficiency virus) bylo zjištěno, že tyto nemocní jsou náchylní k vývoji ne Hodgkinských lymfomů, včetně BL. Tato pozorování vedla ve svém důsledku k určení třetí podskupiny BL ve WHO klasifikaci a to: immunodeficiency-related BL. V roce 1975 byla v buňkách BL objevena charakteristická chromosomová translokace, zahrnující dlouhé rameno chromosomu 14 a dlouhé rameno chromosomu 8, t(8;14)(q24;q32) (Zech *et al.*, 1976). Za několik let později byl v místě zlomu na chromosomu 8 identifikován gen *MYC* a bylo potvrzeno, že translokací dochází k přemístění genu *MYC* (8q24) na chromosom 14, pod kontrolu zesilovače transkripce těžkých řetězců imunoglobulinových genů (*IgH*) (Obrázek 8), což ve svém důsledku vede ke konstitutivní transkripční deregulaci genu *MYC* (Dalla-Favera *et al.*, 1982). Translokace t(8;14) je markrem všech tří subtypů BL. U BL můžeme také pozorovat variantní translokace zahrnující lehké řetězce imunoglobulinových genů *IgK* t(2;8)(p11;q24) a *IgL* t(8;22)(q24;q11) (Blombery *et al.*, 2015). Tyto variantní translokace se vyskytují u přibližně u 15-20 % případů (Campbell *et al.*, 2005). Kromě specifické translokace t(8;14) můžeme u nemocných s BL pozorovat přídatné chromosomové změny a to až v 70%, především u dětských BL. K nejčastějším přídatným chromosomovým změnám pozorovaných u BL, patří duplikace oblasti 1q21-25, delece 13q, 6q11-14, delece 17p a trisomie 7, 8, 12 a 18. Delece 13q a částečná duplikace 1q jsou častěji pozorovány u dětských BL a jejich výskyt je spojován s nepříznivou prognózou (Lones *et al.*, 2004).

Obrázek 8: Parciální karyotyp t(8;14)(q24;q32) u BL



Převzato a upraveno z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0814ID1050.htm>

4. Metody a materiál

4.1. Biologický materiál

Pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření byly použity buňky kostní dřene (KD) infiltrované nádorem a nebo uzliny (U) od pacientů vyšetřovaných pro NHL na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty UP v letech 2014-2015.

Vzorky KD byly odebírány do zkumavky s protisrážlivým činidlem (lithium heparin), vzorky uzliny do zkumavky s 10 ml BM média (bone marrow medium) a následně byly transportovány do laboratoře Cytogenetiky a molekulární cytogenetiky k dalšímu zpracování.

4.1.1. Kultivace biologického materiálu

Přístroje:

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

Spotřební materiál:

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

Chemikálie a roztoky:

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

Kultivace buněk kostní dřene:

1. Kostní dřeň se přenese do kultivační nádoby a přidá se 12 ml BM média (bone marrow medium).

2. Do kultivační nádoby se přidá 12 µl Colcemidu.
3. Vzorek s Colcemidem se kultivuje v inkubátoru při 37 °C a 5% koncentraci CO₂ po dobu 24 hodin a následně je materiál dále zpracováván (viz kapitola 4.1.2.)

Kultivace buněk uzliny:

1. Na Petriho misku se přenesou celý obsah z odběrové zkumavky se vzorkem a vzorek se pomocí skalpelu rozmělní, aby došlo k uvolnění buněk z uzliny.
2. Rozmělněný vzorek uzliny se pomocí pasturovy pipety přenesou do plastové kultivační nádoby s kultivačním médiem.
3. Do kultivační nádoby se následně přidá 12 µl Colcemidu a kultivuje se v termostatu při 37 °C 24 hodin.
4. Druhý den se materiál dále zpracovává (viz kapitola 7.1.2.)

4.1.2. Zpracování biologického materiálu

Přístroje:

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

Spotřební materiál:

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

Chemikálie a roztoky:

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

Pracovní postup:

1. Kultivovaný materiál se přenesou do 15ml centrifugační zkumavky a centrifuguje 10 minut při 37 °C a 1000 rpm.
2. Po centrifugaci se ze zkumavky odsaje supernatant, zvortexuje a k peletu se přidá 10 – 12 ml 0,075M roztoku KCl na 25 minut (inkubace při 37 °C).

3. Po inkubaci se přidá 1 kapka fixačního roztoku (Carnoy – methanol:kyselina octová, 3:1), promíchá se a centrifuguje 10 minut při 1000 rpm při teplotě 37 °C.
4. Po centrifugaci se odsaje supernatant a k peletu buněk se po kapkách přidává cca 1 ml ledově vychlazeného fixačního roztoku, jemně promíchá a poté se zkumavka se vzorkem doplní fixací (cca 10 ml).
5. Materiál se opět promíchá a nechá 30 minut odstát při laboratorní teplotě.
6. Následně se materiál centrifuguje po dobu 10 minut při 1000 rpm a 4 °C.
7. Po centrifugaci se odsaje supernatant a přidá se cca 10 ml fixace a promíchá pomocí vortexu.
8. Opět následuje centrifugace 10 minut při 4 °C a 1000 rpm
9. Celý postup – krok 7. a 8. se opakuje do dosažení mléčného zbarvení suspenze.
10. Výsledná suspenze buněk se uchovává v chladničce, nebo se hned připraví preparáty pro obarvení popř. se suspenze zamrazí na -20 °C.

4.2. Molekulární cytogenetika

Přístroje:

- světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japonsko), CCD kamera (MetaSystems, Altussheim, Německo), Centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA), Flowbox HERAsafe® (Heraeus Holding, Hanau, Německo), fluorescenční lampa U-RFL-T (obojí Olympus, Tokyo, Japonsko), lednička, mraznička, pipety (Gilson, Middleton, WI, USA), Software ISIS (MetaSystems, Altussheim, Německo), stolní centrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), plotýnka Medax (Nagel, Kiel, Německo), vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, Německo), hybridizační komůrka Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK), počítač, přístroj pro přípravu cytogenetických preparátů (Hanabi Metaphase spreader), ThermoBrite (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

Spotřební materiál:

- laboratorní sklo, centrifugační zkumavky Falcon (15ml), (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), centrifugační zkumavky Falcon (50 ml), (TPP®, Trasadingen, Švýcarsko), fixogum Rubber Cement (Marabu, Tamm, Německo), imerzní olej (Olympus, Tokyo, Japonsko), krycí skla (18x18 mm, 22x22 mm), (Menzel-Gläser, Braunschweig, Německo), pasteurovy pipety (10

ml), (Biosigma, Benátky, Itálie), plastové mikrozkuřavky (1,5 ml; 2 ml), (Eppendorf, Hamburg, Německo), podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA)

Chemikálie a roztoky:

- deionizovaná H₂O (HOK), zásobní roztok 20xSSC (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), NP40 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), Counterstain Diluent (Kreatech, Amsterdam, Nizozemí), etanol 70%, 80% a 96% (Fagron, Nieuwerkerk a/d IJssel, Nizozemí), metanol, kyselina octová (obojí Lach-Ner, Neratovice, ČR), Tween20 (Serva, Heidelberg, SRN)

Použité sondy a příprava:

Sondy byly připraveny a následně denaturovány dle přiložených postupů od konkrétního výrobce.

- XL MYC - Break Apart Probe (MetaSystems, Altlussheim, Německo)
- XL BCL6 - Break Apart Probe (MetaSystems, Altlussheim, Německo)
- XL t(11;14) - Translocation, Dual Fusion Probe (MetaSystems, Altlussheim, Německo)
- Vysis LSI IGH/BCL2 - Dual Color, Dual Fusion, Translocation Probe (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)
- Vysis LSI MALT1 (18q21) - Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

4.2.1. FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace)

Pracovní postup:

1. Suspenze buněk se nejprve centrifuguje 10 minut při 1000 rpm a 37 °C. Následně se stáhne supernatant a doplní se novým fixačním roztokem (metanol:kyselina octová, 3:1).
2. Opět se centrifuguje (10 minut, 37 °C, 1000 rpm). Supernatant se stáhne a k peletu se přidá takové množství fixačního roztoku, aby suspenze měla světle mléčnou až čirou barvu.
3. Pro nanesení vzorku na podložní sklo se použije přístroj pro přípravu cytogenetických preparátů – metaphase spreader (pro optimální rozložení buněk a chromosomů v mitózách). Objem kapaného vzorku je asi 20-40 µl.

4. Nakápnutý vzorek se usuší v přístroji při 37 °C po dobu 1 minuty. Hustota buněk na nakapaném podložním sklíčku se kontroluje pomocí světelného mikroskopu.
5. Sklo se vloží do roztoku 2x SSC na 20 minut při laboratorní teplotě.
6. Mezi tím se připraví sonda – příprava sondy se řídí doporučením výrobce.
7. Po inkubaci v roztoku 2x SSC se sklo odvodňuje ve vzestupné řadě ledových alkoholů po dobu 2 minut (70%, 80%, 96% etanol).
8. Následně se sklo usuší na předehřáté plotýnce (45 °C). Mezitím se na krycí skla (18x18 mm) pipetuje 5 µl příslušné sondy. Krycí sklo se sondou se přiloží na podložní sklo s připravenou buněčnou suspenzí.
9. Krycí sklo se zalepí nanesením ruber cementu kolem skla tak, aby během 24hodinové hybridizace při 37°C nedošlo k odpaření sondy.
10. Takto připravené preparáty se vkládají k denaturaci při 75 °C do ThermoBrite na dobu 5 minut.
11. Po denaturaci se vzorek dává hybridizovat do vlhké hybridizační komůrky na 24 hodin při 37 °C.
12. Další den se odstraní ruber cement spolu s krycím sklíčkem. Sklo s buňkami se promývá 2 minuty v 0,4x SSC + 0,3% NP40 při 73 °C ve vodní lázni a dále ve 2x SSC + 0,1% NP40 při laboratorní teplotě.
13. Sklo se nechá usušit (plotýnka, 45 °C). Na krycí skla (22x22 mm) se napipetuje 8 µl DAPI a vzorek je připraven k hodnocení.
14. Výsledek hybridizace je hodnocen ve fluorescenčním mikroskopu se sadou fluorescenčních filtrů propouštějícími fluorescenci příslušných fluorochromů, kterými byly naznačeny použité sondy.
15. Hodnocený obraz je pomocí digitální CCD kamery a softwaru ISIS (MetaSystems) snímán a následně uložen v počítači.
16. Při hodnocení interfázních jader se vyhodnocuje 300 buněk. Za patologický nález se považuje hodnota nad 10 % patologických buněk v jednotlivém preparátu (do 10 % se jedná o hodnotu cut-of použité sondy).

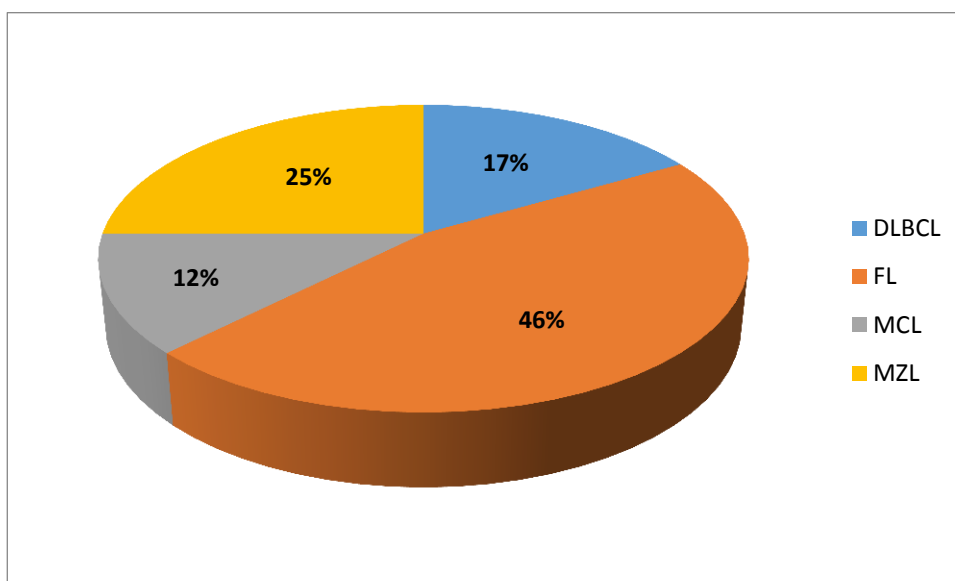
5. Výsledky

V praktické části bakalářské práce jsem prováděla molekulárně cytogenetické vyšetření buněk kostní dřeně a uzliny metodou FISH u souboru 24 pacientů s diagnostikovaným ne Hodgkinským lymfomem. Soubor pacientů byl vyšetřován v období od dubna roku 2014 do prosince roku 2015 a jednalo se o 20 pacientů nově diagnostikovaných a 4 pacienty v relapsu onemocnění. Věkový medián u celého souboru pacientů byl 60 let (40-74 let). V rámci souboru bylo vyšetřováno 16 žen (67 %) a 8 mužů

(33 %). Jednalo se o 4 nemocné s diagnostikou DLBCL, 11 nemocných s FL, 3 pacienty s MCL a 6 s MZL. Celkem 5 nemocných bylo vyšetřeno z uzliny, zbytek nemocných z buněk kostní dřeně.

Základní údaje o vyšetřovaných pacientech jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 3). Zastoupení jednotlivých subtypů NHL v rámci celého souboru pacientů je znázorněno v grafu (Graf 1).

Graf 1: Zastoupení jednotlivých subtypů NHL ve vyšetřovaném souboru



Tabulka 3: Základní údaje vyšetřovaných pacientů

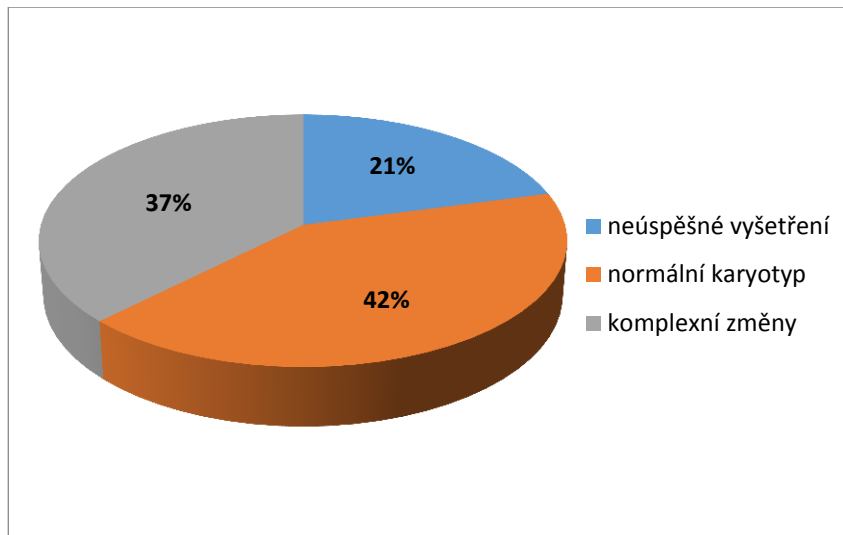
Pacient č.	Ž/M	Rok narození	Věk při diagnose	Žije/nežije	Vyšetřovaný materiál	Diagnosa
HM63	Ž	1963	52	žije	U	DLBCL
HD60	Ž	1960	55	žije	U	DLBCL
ŠM56	Ž	1956	59	žije	U	DLBCL
KB51	M	1951	64	žije	U	DLCBL
HJ75	Ž	1975	40	žije	KD	FL
KJ54	Ž	1954	61	žije	KD	FL
KL63	Ž	1963	52	žije	KD	FL
KJ47	M	1947	68	žije	KD	FL
MS52	M	1952	59	žije	KD	FL
PJ59	M	1959	56	žije	KD	FL
PJ50	M	1950	65	žije	KD	FL
RJ60	Ž	1960	55	žije	KD	FL
SA52	Ž	1952	63	žije	KD	FL
VJ49	M	1949	66	žije	KD	FL
VM51	M	1951	64	žije	KD	FL
KE53	Ž	1953	61	žije	KD	MCL
SA73	Ž	1973	42	žije	KD	MCL
ŠD45	Ž	1945	69	žije	KD	MCL
ČM43	Ž	1943	72	žije	KD	MZL
KL45	M	1945	70	nežije	KD	MZL
RM53	Ž	1953	43	žije	KD	MZL
SA41	Ž	1941	74	žije	KD	MZL
TH48	Ž	1948	67	žije	KD	MZL
UM47	Ž	1947	68	žije	U	MZL

Legenda: Ž – žena, M – muž, KD – kostní dřev, U – uzlina, DLBCL – difúzní B velkobuněčný lymfom, FL – folikulární lymfom, MCL – lymfom z pláštových buněk, MZL – lymfom marginální zóny

5.1. Výsledky vstupního cytogenetického vyšetření

Cytogenetické vyšetření bylo provedeno u všech 24 pacientů. U 5 pacientů (21 %) bylo vyšetření neúspěšné, 10 pacientů (42 %) mělo normální karyotyp a u 9 pacientů (37 %) byly prokázány komplexní změny karyotypu (Graf 2; Tabulka 4).

Graf 2: Výsledky konvenční cytogenetiky u souboru 24 pacientů s NHL



Tabulka 4: Výsledky konvenční cytogenetiky u souboru 24 pacientů s NHL

Pacient	Diagnosa	Výsledek KC	Nález
HM63	DLBCL	46,XX,add(1p),?der(11),?der(12),add(14q),der(18)[26]/46,XX[6]/47XX,add(1p),?der(11),?der(12),add(14q),der(18),+mar[1]46,XX,add(1p),?der(3),?der(11),?der(12),add(14q),der(18),-21,+mar[1]	KZ
HD60	DLBCL	46-47,XX,der(1),?der(2),?+der(3),?der(7),?der(9),der(11),-13,-14,-15,?del(17p),?+18,-22,+1-3mar[cp11]/45,XX,der(1),?+der(3),?-4,-9,-11,-12,-13,-14,-15,?del(17p),?+18,-20,-21,-22,+7mar[cp9]	KZ
ŠM56	DLBCL	50,XX,?+6,?+8,?+9,?+12,?der(14),?der(17),?der(18)[28]	KZ
KB51	DLCBL	47-48,XY,der(1),?der(2),?der(3),?-9,-14,?der(17),+3-4mar[cp18]/46,XY[2]	KZ
HJ75	FL	46,XX[20]	N
KJ54	FL	Nelze hodnotit	0
KL63	FL	48,XX,add(1p),?der(3),?der(6),?der(11),?der(13),?der(14),+2mar[cp4]/46,XX[26]	KZ
KJ47	FL	46,XY[19]	N
MS52	FL	46,XY,t(14;18)(q32;q11)[8]/46,XY,?5,t(14;18)(q32;q11),+mar[2]/46,XY[5]	KZ
PJ59	FL	46,XY[20]	N
PJ50	FL	46,XY[24]	N
RJ60	FL	46,XX[24]	N
SA73	FL	46,XX[30]	N
VJ49	FL	46,XY[29]	N
VM51	FL	Nelze hodnotit	0
KE53	MCL	46,XX[24]	N
SA73	MCL	46,XX[13]	N
ŠD45	MCL	46,XX[10]	N
ČM43	MZL	Nelze hodnotit	0
KL45	MZL	Nelze hodnotit	0
RM53	MZL	43-44,X,-X,der(1),?der(3),?-9,der(11),?der(12),-13,-14,-15,?der(18),+23mar[cp8]/46,XX[12]	KZ
SA41	MZL	47-48,XX,?+der(3),?-7,-9,add(11q),?+18,-19,+2-3mar[cp3]/46,XX[27]	KZ
TH48	MZL	Nelze hodnotit	0
UM47	MZL	47-48,XX,?der(3),?der(7),+1-2mar[cp10]/46,XX[4]	KZ

Legenda: *KD* – kostní dřev, *U* – uzlina, *DLBCL* – difúzní B velkobuněčný lymfom, *FL* – folikulární lymfom, *MCL* – lymfom z pláštěvých buněk, *MZL* – lymfom marginální zóny, *0* – neúspěšné vyšetření, *N* – normální nález, *KZ* – komplexní změny, *[cp]* – kompozitní karyotyp podle ISCN, *mar-* marker chromosom podle ISCN

5.2. Vyhodnocení souboru pacientů metodou FISH

Pro další vyhodnocení metodou FISH byl celý soubor pacientů rozdělen do čtyř skupin dle stanovené diagnózy do jednotlivých subtypů NHL.

5.2.1. Soubor pacientů s difúzním B velkobuněčným lymfomem (DLBCL)

Soubor byl tvořen 4 pacienty, u kterých byl na základě vstupních vyšetření diagnostikován difúzní B velkobuněčný lymfom. Jednalo se o 3 ženy a 1 muže. K datu 25.1.2016 všichni pacienti žili. Věkový medián pacientů vyšetřovaných pro DLBCL byl 58 let (52-64 let). U všech pacientů byla vyšetřovaným materiálem lymfatická uzlina a vyšetření bylo prováděno v době diagnózy onemocnění.

Pomocí FISH byly u DLBCL sledovány tři geny: *BCL2*, *MYC* a *BCL6*. Přestavba genu *BCL2* a zároveň fúze genů *BCL2* a *IgH* odpovídající translokaci t(14;18)(q32;q21) byla prokázána u 2 pacientů. U dalších dvou pacientů přestavba prokázána nebyla, ale byly prokázány nadpočetné kopie genu *BCL2*. Přestavba genu *MYC* v souboru prokázána nebyla, u tří pacientů byly prokázány nadpočetné kopie genu *MYC*. Přestavba genu *BCL6* také prokázána nebyla, u dvou pacientů byly prokázány nadpočetné kopie genu *BCL6* (Tabulka 5).

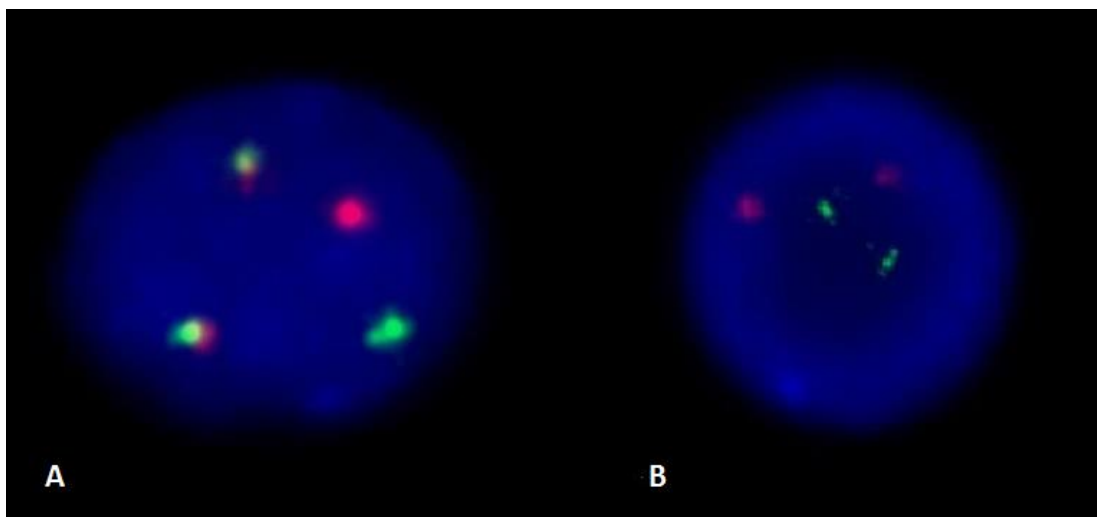
Tabulka 5: Přehled výsledků FISH u DLBCL

Pacient	Počet patologických buněk	BCL2	MYC	BCL6
HD60	90 %	3 signály	Normální nález	3 signály
HM63	60 %	t(14;18)(q32;q21)	3 signály	Normální nález
KB51	80 %	3 signály	3 signály	3 signály
ŠM56	90 %	t(14;18)(q32;q21)	3 signály	Normální nález

Obrázek 9 : Výsledek metody FISH na interfázních jádrech se sondou LSI IGH/BCL2 u DLBCL

(převzato z HOK FNOL)

A) přestavba genu *BCL2* (fúze s genem *IgH* vytváří fúzní signál na obou chromosomech, na interfázním jádře pozorujeme jeden zelený, jeden červený a dva fúzní signály-1R1G2F); B) normální nález pro gen *BCL2* (dva červené a dva zelené signály-2R2G)

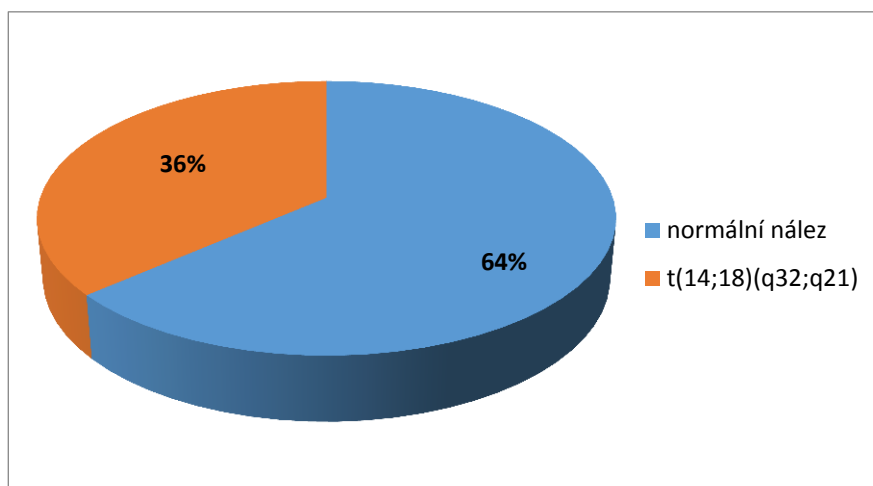


5.2.2. Soubor pacientů s folikulárním lymfomem (FL)

V souboru pacientů s diagnostikovaným FL bylo vyšetřeno celkem 11 pacientů, z toho 6 mužů (55 %) a 5 žen (45 %). Věkový medián vyšetřovaných osob byl 59 let (40-68 let). Vyšetření bylo provedeno u 8 pacientů v době diagnózy a u 3 v době relapsu. Vyšetřovaným materiálem byla u všech pacientů kostní dřeň.

Pomocí metody FISH byly sledovány změny genu *BCL2*. Přestavba genu *BCL2* a zároveň fúze genů *BCL2* a *IgH* odpovídající translokaci t(14;18)(q32;q21) byla prokázána u 4 pacientů. U 7 pacientů nebyly pozorovány žádné početní ani strukturní změny genu *BCL2*, byl u nich pozorován normální nález pro gen *BCL2* (Tabulka 6; Graf 3).

Graf 3: Výsledky vyšetření FISH u FL



Tabulka 6: Přehled výsledků FISH u FL

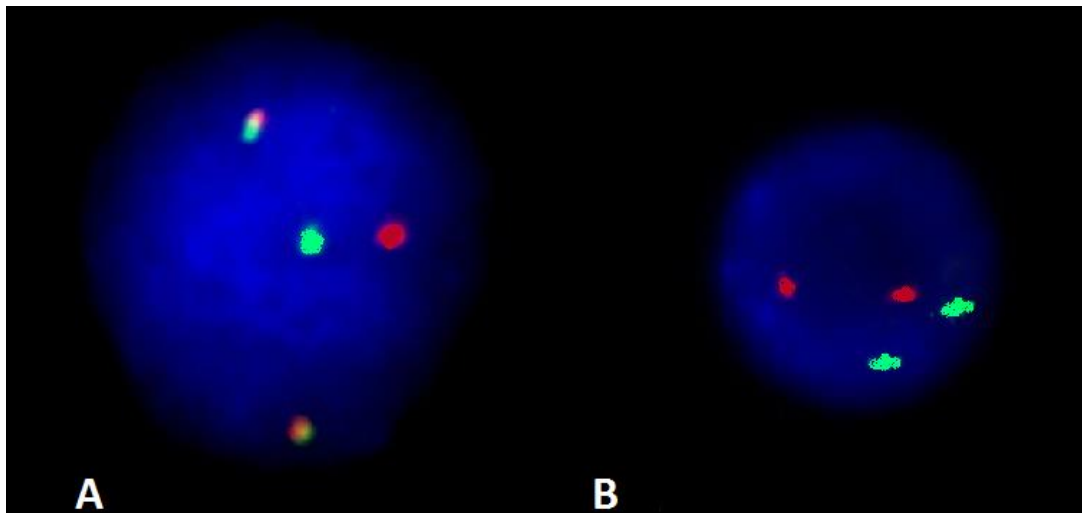
Pacient	Počet patologických buněk	BCL2
HJ75	X	Normální nález
KJ54	X	Normální nález
KL63	65 %	t(14;18)(q32;q21)
KJ47	X	Normální nález
MS52	26 %	t(14;18)(q32;q21)
PJ59	X	Normální nález
PJ50	7 %	t(14;18)(q32;q21)
RJ60	5%	t(14;18)(q32;q21)
SA52	X	Normální nález
VJ49	X	Normální nález
VM51	X	Normální nález

Legenda: X – nepřítomnost patologických buněk

Obrázek 10: Interfázních FISH sondou LSI IGH/BCL2 u FL

(převzato z HOK FNOL)

A) přestavba genu *BCL2(1R1G2F)*; B) normální nález pro gen *BCL2 (2R2G)*



5.2.3. Soubor pacientů pro s lymfomem z pláštěových buněk (MCL – Mantle cell lymphoma)

Byly vyšetřeny 3 pacientky s diagnosou MCL. Medián věku vyšetřovaných pacientek byl 57 let (42-69 let). Vyšetřovaným materiálem byla kostní dřeň a vyšetření bylo provedeno v době diagnózy.

Pomocí FISH byla sledována přítomnost přestavby $t(11;14)(q13;q32)$ a fúze genů *BCL1* a *IgH*. U dvou ze tří vyšetřovaných pacientů byla prokázána fúze genů *BCL1* a *IgH* odpovídající translokaci $t(11;14)(q13;q32)$ (Tabulka 7).

Tabulka 7: Přehled výsledků FISH u MCL

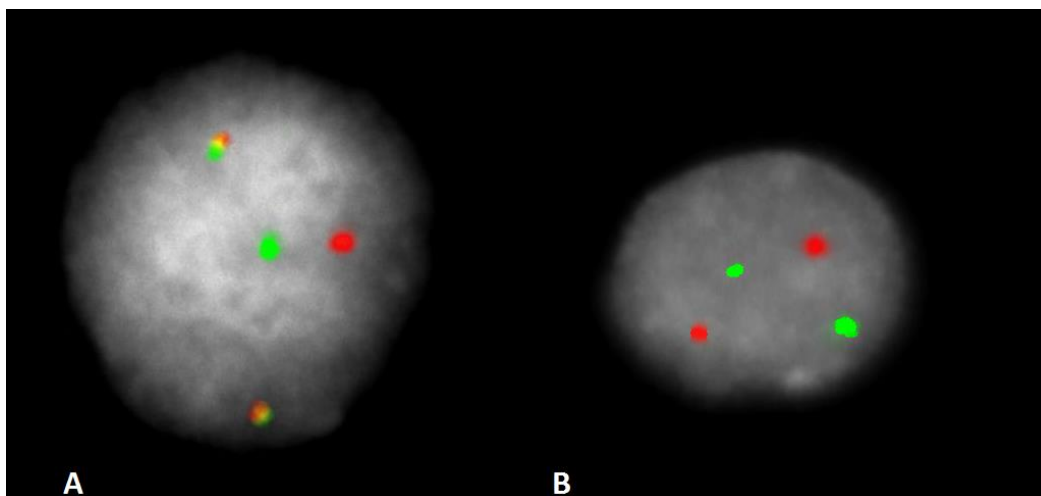
Pacient	Počet patologických buněk	$t(11;14)(q13;q32)$
KE53	21 %	$t(11;14)(q13;q32)$
SA73	X	Normální nález
ŠD45	17 %	$t(11;14)(q13;q32)$

Legenda: X – nepřítomnost patologických buněk

Obrázek 11: Výsledek metody FISH na interfázních buňkách kostní dřeně se sondou XL t(11;14)

(převzato z HOK FNOL)

A) translokace t(11;14) (1R1G2F); B) normální nález (2R2G)



5.2.4. Soubor pacientů s lymfomem marginální zóny – MALT (MZL)

Soubor tvořilo 6 pacientů s diagnostikovaným MZL. K datu 25.1.2016 jeden z pacientů nežije (KL45). Ostatních 5 pacientů žilo a jedná se o ženy. Vyšetřovaným materiálem byla u 1 pacienta uzlina, u ostatních pacientů kostní dřeň. Vyšetření bylo prováděno jak v době diagnosy u 5 pacientů, tak u 1 pacienta v době relapsu (RM53). Medián věku vyšetřovaných pacientů byl 66 let (43-72 let).

Pomocí FISH byly sledovány změny genu *MALT1*. Přestavba genu *MALT1* v našem souboru prokázána nebyla. U 1 pacienta byly prokázány nadpočetné kopie genu *MALT1* (prokázány 3 fúze genu *MALT1*). U ostatních pacientů byl prokázán normální nález pro gen *MALT1* (Tabulka 8).

Tabulka 8: Přehled výsledků FISH u MZL

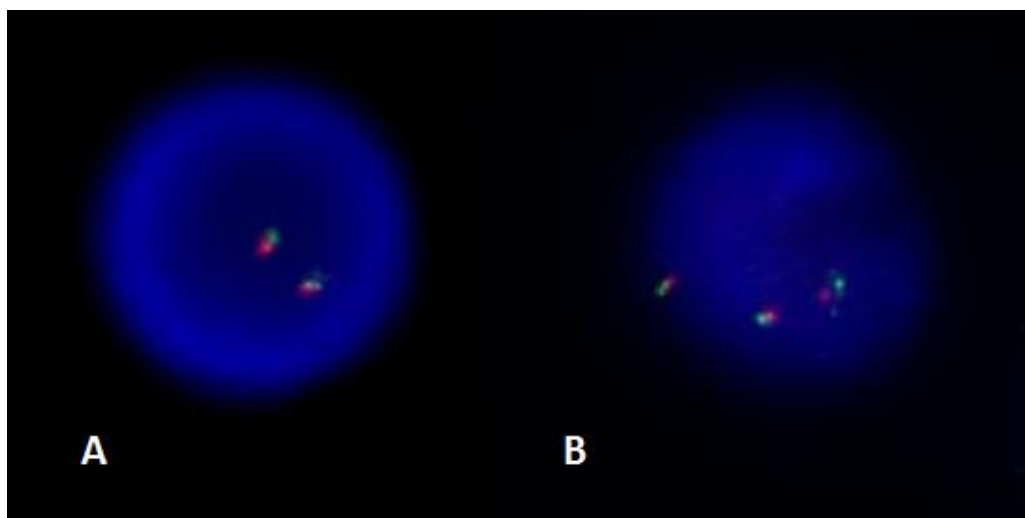
Pacient	Počet patologických buněk	MALT1
ČM43	X	Normální nález
KL45	X	Normální nález
RM53	X	Normální nález
SA41	12 %	3 fúze
TH48	X	Normální nález
UM47	X	Normální nález

Legenda: X – nepřítomnost patologických buněk

Obrázek 12: Výsledek FISH na interfázních buňkách se sondou LSI MALT1 (18q21)

(převzato z HOK FNOL)

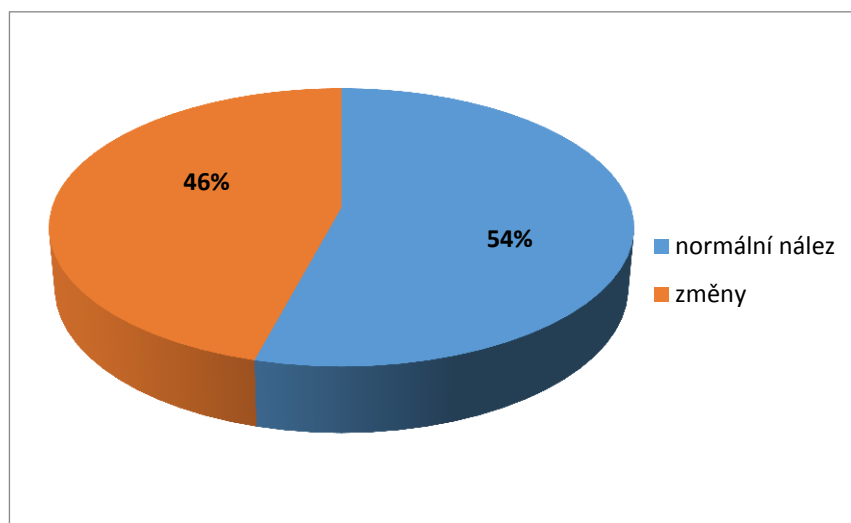
A) normální nález pro gen *MALT1*(2F); B) nadpočetné kopie genu *MALT1*(2F)



5.2.5. Celkové vyhodnocení výsledků vyšetřovaného souboru

Metodou FISH se specifickými sondami bylo vyšetřeno celkem 24 nemocných s diagnózou NHL. Abnormální nález pro vyšetřené sondy byl pozorován u 11 pacientů (46%) zatím co normální nález byl pozorován u 13 pacientů (54%)(graf 4).

Graf 4: Celkové zhodnocení výsledků metody FISH u souboru pacientů s NHL



6. Diskuze

NHL jsou heterogenní skupinou hematologických malignit. Na základě výsledků imunohistochemie, imunofenotypizace, cytogenetiky, molekulární cytogenetiky a molekulární genetiky je možné NHL rozdělit do specifických subtypů. Tato práce byla zaměřena na studium primárních změn vyskytujících se u vybraných subtypů NHL s využitím molekulárně cytogenetické metody FISH.

Vyšetřovaným materiálem u souboru pacientů byly buňky kostní dřeně nebo buňky lymfatické uzliny. Cytogenetické vyšetření KD u pacientů s diagnostikovaným NHL patří k doporučeným vyšetřením pro detekci infiltrace KD nádorem. Dle stážovacího systému se pacienti s infiltrací KD řadí do vyššího klinického stádia a mají výrazně horší prognosu než pacienti, kteří nemají KD infiltrovanou nádorem (Kumar *et al.*, 2009). Z našeho souboru 19 vyšetřených pacientů z KD jsme pomocí konvenční cytogenetiky a FISH prokázali změny pouze u 8 (42 %) pacientů. Důvodem nízkého zachytu cytogenetických změn byla velmi nízká infiltrace KD buňkami nádoru. Přes velký význam použití metody FISH pro detekci primárních změn, má tato metoda i své limitace. Jednou z nich je cut-off sondy, hranice, která určuje citlivost sondy. Pro genové sondy se obvykle pohybuje v rozmezí 5-10%, podle typu sondy a výrobce. Proto taková nízká infiltrace kostní dřeně buňkami nádoru je pro metodu FISH limitací (Wolff *et al.*, 2007). Medián věku vyšetřovaných osob byl 60 let (40-74 let). Tato hodnota se blíží hodnotám uváděných v literatuře, kde se uvádí medián věku nově diagnostikovaných osob pod 65 let (Indrák, 2006-2007).

U pacientů s diagnosou FL byla sledována přestavba genu *BCL2* a přítomnost translokace t(14;18)(q32;q21). Tato primární změna se u FL vyskytuje u 80-90 % případů (Campbell *et al.*, 2005). V našem souboru 11 pacientů s FL byla translokace detekována pouze u 4 pacientů (36 %). U zbylých 7 pacientů byl prokázán normální nález pro gen *BCL2*. Tento nízký výskyt primární změny je ovlivněn malým počtem vyšetřených pacientů v souboru a nízkou infiltrací KD buňkami nádoru.

U pacientů s DLBCL byly sledovány změny v genech *BCL2*, *BCL6* a *MYC*. Přestavba genu *BCL2* je jednou z nejčastěji pozorovaných změn u DLBCL, nicméně její prognostický význam není zatím jednoznačně určen. Přesto některé studie ukazují, že by mohl být spojen s prognosticky příznivější podskupinou GCB DLBCL (Nogai *et al.*, 2011). V našem souboru byla přestavba genu *BCL2* a t(14;18) pozorována u 2 ze 4 pacientů.

Přestavba genu *BCL6* (3q27) je v literatuře popisována u přibližně 25 % pacientů s DLBCL. Řada cytogenetických studií prokázala, že pacienti s přestavbou genu *BCL6* mají výrazně horší prognózu, než pacienti bez přestavby genu *BCL6* (Campbell *et al.*, 2005). Navíc některé studie naznačují, že přestavba genu *BCL6* se vyskytuje častěji u prognosticky horšího podtypu ABC DLBCL určeného pomocí GEP (Iqbal *et al.*, 2007). Naopak zmnožení oblasti 3q nebo trisomie chromosomu 3 byla pozorována častěji u prognosticky příznivější skupiny GCB DLBCL. V našem souboru 4 DLBCL pacientů nebyla přestavba genu *BCL6* detekována. U 2 pacientů byly detekovány nadpočetné kopie genu *BCL6*, které se mohou projevit v rámci polysomií chromosomu 3 nebo jako zmnožení dlouhého raménka chromosomu 3 (Campbell *et al.*, 2005).

Přestavba genu *MYC* je pozorována přibližně u 2-10 % pacientů s DLBCL (Kramer *et al.*, 1998; Vitalo *et al.*, 1998). Určení přestavby má prognostický význam, jelikož je spojována s agresivnější formou lymfomu (Kramer *et al.*, 1998; Vitalo *et al.*, 1998). V případě prokázání přestavby genu *MYC* a dalších onkogenů (např. *BCL2*, *BCL6*, *BCL1*) v rámci jednoho onemocnění se jedná o tzv. lymfom se dvěma zásahy (double hit lymphoma), který se vyznačuje vysokou agresivitou onemocnění a krátkým přežitím pacientů (Chastain *et al.*, 2015). V našem souboru pacientů přestavba genu *MYC* prokázána nebyla. U 3 ze 4 pacientů byly pozorovány pouze nadpočetné kopie genu *MYC*.

MCL je agresivní onemocnění vyžadující včasnou léčbu. Vzhledem k tomu, že převážná většina MCL nese translokaci t(11;14), která se u jiných typů lymfomů téměř nevyskytuje, tak se jedná o změnu významně specifickou pro toto onemocnění. Ze souboru 3 pacientů byla translokace t(11;14) prokázána u dvou z nich. Důvodem, proč jsme u pacientky neprokázali t(11;14) může být přítomnost variantní translokace t(2;11) nebo t(11;22), kterou jsme u této nemocné nevyšetřovali (Blombery *et al.*, 2015). Soubor těchto MCL pacientů tvořily pouze ženy, nicméně literatura uvádí, že převážná většina postižených osob tímto lymfomem jsou muži (M:Ž = 2-4:1) (Papajík *et al.*, 2007).

Soubor pacientů s MZL zahrnoval 6 pacientů. Sledovanou změnou u daného lymfomu byla přestavba genu *MALTI*, která je specifická pro toto onemocnění, ale nevyskytuje se u všech typů MALT lymfomů. Přestavba genu *MALTI*, kdy dochází k translokaci t(11;18)(q21;q21) je pozorována u 30-50 % (Campbell *et al.*, 2005). V našem souboru pacientů tato změna nebyla prokázána, pouze u jednoho pacienta byly prokázány nadpočetné kopie genu *MALTI* v kombinaci s komplexními změnami karyotypu v

konvenční cytogenetice. Konvenční cytogenetika odhalila změny také u dalších 2 pacientů, kteří měli normální nález pro gen *MALT1*.

7. Závěr

Cílem bakalářské práce byla rešerše literárních údajů o vybraných typech ne Hodgkinových lymfomů, jeho klasifikaci a o chromosomových změnách vyskytujících se u jednotlivých vybraných subtypů NHL, které byly vyšetřovány pomocí cytogenetických metod. Detekovanými změnami u souboru pacientů byly u DLBCL a FL přestavba genu *BCL2* a následná fúze genu *BCL2* a *IgH*. U DLBCL dále nadpočetné kopie genu *MYC* a *BCL6*. U pacientů s MCL byla vyšetřována translokace $t(11;14)(q13;q32)$ a fúze genu *BCL1* a *IgH* a u pacientů s MZL byla studována přestavba genu *MALT1*. V průběhu řešení bakalářské práce jsem se seznámila s chodem laboratoře, s rutinním používáním především metody FISH a jejím přínosem pro každodenní klinickou praxi. Výsledky bakalářské práce na příkladech vybraných subtypů NHL ukázaly, že určování chromosomových změn pomocí cytogenetiky a metody FISH jsou součástí rutinní diagnostiky a určování prognózy u NHL.

8. Citace

AKASAKA, H., AKASAKA, T., KURATA, M., et al. (2000): Molecular anatomy of BCL6 translocation revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Research*. 60: 2335-2341.

ALIZADEH, A. A., EISEN, M. B. B., DAVISS, R. E., et al. (2000): Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-511.

BEA, S., CAMPO, E. (2008): Secondary Genomic Alterations In Non-Hodgkin's Lymphomas: Tumor-Specific Profiles With Impact On Clinical Behavior. *Haematologica* 93: 641-645.

BEA, S., ZETTL, A., WRIGHT, G., SALAVERRIA, I., et al. (2005): Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Neoplasia* 106: 3183-90.

BLOMBERG, A. P., WALL, M., SEYMOUR, F. J. (2015): The molecular pathogenesis of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *European Journal of Haematology* 95: 280-293.

BORNKAMM, G. W. (2009): Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *International Journal of Cancer* 124(8): 1745-1755.

BURKITT, D. (1958): A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*. 46: 218-223.

CAMBIER, J. C., GAULD, S. B., MERRELL, K. T., VILEN, B. J. (2007): B-cell anergy: From transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology* 7(8): 633-643.

CAMPBELL, L. J., et al. (2005): Cytogenetics of lymphomas. *Pathology* 37(6): 493-507.

COMPAGNO, M., LIM WK., GRUNN, A., et al. (2009): Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459: 717-721.

DALLA-FAVERA, R., BREGNI, M., ERIKSON, J., PATTERSON, D., GALLO, R. C., CROCE, C. M. (1982): Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cell. *Proc Natl Acad Sci.* 79: 7824-7827.

ELENITOBA-JOHNSON, K. S., GASCOYNE, R. D., LIM M. S., et al. (1998): Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood* 91(12): 4677-4685.

FELLNEROVÁ, I., BEZDÍČEK, J. (2014): Praktická cvičení z fyziologie člověka a živočichů, pp. 15. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

FU, K., WEISENBURGER, D. D., GREINER, T. C., et al. (2005): Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathological study based on gene expression profiling. *Blood* 106: 4315-4321.

GESK, S., KLAPPER, W., et al. (2006): A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 108: 1109-1110.

GOD, J. M., HAQUE, A. (2010): Burkitt Lymphoma: Pathogenesis and Immune Evasion. *Journal of Oncology*. Article ID 516047, 14 pages.

GREINER, T. C., MOYNIHAN, M. J., CHAN, W. C., et al. (1996): p 53 mutations in mantle cell lymphoma associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 87: 4302-4310.

GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., et al. (2000): *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman and Company, New York.

HEIM, S., MITELMAN, F. (1987): Cancer cytogenetics. Liss, New York.

HERNANDEZ, L., BEA, S., PINYOL, M., et al. (2005): CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res* 65: 2199-2206.

CHASTAIN, E. J., DUNCAVAGE, E. J. (2015): Clinical Prognostic Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 139: 602-607.

ICHIKAWA, A., KONOSHITA, T., WATANABE, T., et al. (1997): Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 337(8): 529-534.

INDRÁK, K., et al. (2006/2007): Hematologie. Vydavatelství, TRITON Praha/Kroměříž.

IQBAL, J., GREINER, T. C., PATEL, K., et al. (2007): Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 21: 2332-2343.

IQBAL, J., MEYER, P. N., SMITH, L., et al. (2011): BCL2 Predicts Survival in Germinal Center B-cell-like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with CHOP-like therapy and Rituximab. *Clinical Cancer Research*. 20: 1158-1178.

ISCN (1991): An international system for human cytogenetic nomenclature. Guidelines for Cancer Cytogenetics: Supplement. Ed. F. Mitelman.

JARDIN, F., RUMINY, P., BASTARD, CH., TILLY, H. (2007): The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathologie Biologie* 55: 73-83.

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

KEARNEY, L. (2005): Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenetics and genome research*. 114: 189-198.

KRAMMER, M. H., HERMANS, J., WIJBURG, E., et al. (1998): Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 92(9): 3152-3162.

KUMAR, S., RAU, A. R., NAIK, R., et al. (2009): Bone marrow biopsy in non-Hodgkin lymphoma: a morphological study. *Indian J Pathol Microbiol*. 52(3): 332-338.

LENZ, G., WRIGHT, G. W., EMRE, N. C. T., et al. (2008): Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *The National Academy of Science of the USA*. 105: 13520-13525.

LEROUX, D., LE MARC'HADOUR, E., et al. (1991): NonHodgkin's lymphoma with t(11;14)(q13;q32): a subset of mantle zone/intermediate lymphocytic lymphoma? *British Journal of Haematology* 77: 346-353.

LIEHR, T., STARKE, H., WEISE, A., LEHRER, H., CLAUSSEN, U. (2004): Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol*, 19: 229-237.

LONES, M. A., SANGER, W. G., LE BEAU, M. M., et al. (2004): Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: a report from Children's Cancer Group Study CCG-E08. *J Pediatr Hematol Oncol*. 26: 169-178.

MCNEIL, N. et RIED T. (2000): Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev. Mol. Med*. 2: 1-14.

MICHALOVÁ, K. (1999): Úvod do lidské cytogenetiky. Vydavatelství IDV ZV, Brno.

MICHALOVÁ, K., ZEMANOVÁ, Z. (2005): Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi. *Klin. Biochem. Metab.* 13(34): 63-67.

MOKRÝ, J. (1997): Vývoj B-lymfocytů v primárních a sekundárních lymfatických orgánech. *Lék. Zpr. LF UK Hradec Králové* 5-6: 111-120.

NOGAI, H., BERND, D., GEORG, L. (2011): Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 29: 1803-1811.

ORKIN, S. H., ZON, L. I. (2008): Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132: 631-644.

OTT, G., KALLA, J., OTT, M. M., et al. (1997): Blastoid variants of mantle cell lymphoma: Frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood*. 89: 1421-1429.

PAPAJÍK, T., PROCHÁZKA, V., VÁŠOVÁ, I., et al. (2007): Lymfom z pláštěvých buněk – od zpřesnění diagnostiky k hledání účinné terapie. Databáze tuzemských onkologických konferenčních abstrakt. XIV. Jihočeské onkologické dny.

PASQUALUCCI, L., NEUMEISTER, P., GOOSSENS, T., et al. (2001): Hypermutation of multiple proto-onkogenes in B-Cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412: 341-346.

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

PIETERSMA, F., PIRIOU, E., VAN BAARLE, D. (2008): Immune surveillance of EBV-infected B cells and the development of non-Hodgkin lymphomas in immunocompromised patients. *Leukemia and Lymphoma* 49(6): 1028-1041.

PINYOL, M., BEA, S., PLA, L., et al. (2007): Inactivation of RB1 in mantle cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood* 109: 5422-5429.

PINYOL, M., HERNANDEZ, L., CAZORLA, M., et al. (1997): Deletations and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 89: 272-280.

PYTLÍK, R., BERKOVÁ, A., PTÁČNÍK, V. (2013): Moderní diagnostika a léčba nehodgkinských lymfomů. *Interní Med.* 15(3-4): 105-109.

RODAK, B. F., FRISTMA, G. A., DOIG, K. (2007): *Hematology: clinical principles and applications.*

ROSENWALD, A., WRIGHT, G., LEROY, K., et al. (2002): The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 1937-1947.

ROSENWALD, A., WRIGHT, G., LEROY, K., et al. (2003): Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 198: 851-862.

ROSENWALD, A., WRIGHT, G., WIESTNER, A., et al. (2003): The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 3: 185-197.

ROWLEY, J. D. (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 243(5405): 290-293.

SANDER, C. A., YANO, T., CLARK, H. M., et al. (1993): P53 Mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 82(7): 1994-2004.

SAVAGE, K. J., MONTI, S., KUTOK, J. L., et al. (2003): The molecular signature of mediastinal large B cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 102: 3871-3879.

SHERR, C. J., McCORMICK, F., (2002): The RB and p 53 pathways in cancer. *Cancer cell* 2: 103-112.

SCHAFFNER, C., IDLER, I., STILGENBAUER, S., et al. (2000): Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2773-2778.

SCHMIDLIN, H., DIEHL, S. A., NAGASAWA, M., et al. (2008): Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression. *Blood* 112: 1804-1812.

STEFANCIKOVA, L., MOULIS, M., FABIAN, P., VASOVA, I., et al. (2011): Prognostic impact of p53 aberrations for R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *International Journal of Oncology*. 39(6): 1413-1420.

STREUBEL, B., LAMPRECHT, A., DIERLAMM, J., et al. (2003): T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 101: 2335-2339.

SÝROVÁ, A., BELADA, D., SMOLEJ, L., PYTLÍK, R., et al. (2010): Určování rozsahu onemocnění u non-Hodgkinových lymfomů – doporučení Kooperativní lymfomové skupiny. *Klin Onkol*. 23(3): 146–154.

ŠMARDOVÁ, J., MOULIS, M., LIŠKOVÁ, K., KOPTÍKOVÁ, J., HRABÁLKOVÁ, R., KLUSÁKOVÁ, J. (2014): Lymfom se dvěma zásahy – Přehled literatury a kazuistika. *Klin Onkol* 27(1): 24-32.

THELANDER, E. F., ICHIMURA, K., CORCORAN, M., et al. (2008): Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia&Lymphoma*. 49: 477-487.

TIBILETTI, M. G., MARTIN, V., BERNASCONI, B., et al. (2009): BCL2, BCL6, MYC, MALT1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Human pathology*. 40: 645-652.

VITALO, U., GAIDANO, G., BOTTO, B., et al. (1998): Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol*. 9(1): 55-61.

WILLIAMS, H., CRAWFORD, D. H. (2006): Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood* 107(3): 862–869.

WOLFF, J. D., BAGG, A., COOLEY, D. L., et al. (2007): Guidance for Fluorescence in Situ Hybridization Testing in Hematologic Disorders. *J Mol Diagn*. 9(2): 134-143.

ZECH, L., HAGLUND, U., NILSSON, K., KLEIN, G. (1976): Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 17: 47-56.

ZVÁROVÁ, M., CELEROVÁ, J. (2011): Hematologie a transfúzní služba služba – učební texty pro studenty. SŽŠ Lipová v Brně.

9. Seznam použitých zkratek

BCR	B buněčný receptor
BL	Burkittův lymfom
BM medium	bone marrow medium
CCD kamera	charge-coupled device camera
COP	cyklofosfamid, vincristin, prednison
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DLBCL	difúzní velkobuněčný B lymfom
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
EBV	Epstein-Barr virus
FCD	folliculardendritic cell
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FL	folikulární lymfom
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
GC	germinální centra
GCB	germinal centre of B-lymphocyte
GEP	gene expression profiling
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOK	Hemato-onkologická klinika
HSC	hematopoetic stem cells – hematopoetická kmenová buňka
CHOP	cyklofosfamid, adriablastin, vincristin, prednison
ICR	intermediate cluster region
IgH	gen pro těžký řetězec imunoglobulinu
ISCN	International System for Human Chromosome Nomenclature
KD	kostní dřeň
LSI	označení pro lokusově specifickou sondu
MBR	major breakpoint region
MCL	mantle cell lymphom, lymfom z plášťových buněk
mcr	minor cluster region
mFISH	multicolor FISH; mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace

MZL	lymfom marginální zóny
NHL	nehodgkinské lymfomy
NK-buňky	natural killer buňky; druh lymfocytu
NP40	nonyl phenoxypolyethoxyethanol
PMBL	primární mediastinální B lymfom
RAG	recombination-activating gene
Rb	retinoblastomový protein
rpm	rounds per minute; otáčky za minutu
SHM	Somatic hypermutation – somatická hypermutace
SSC	saline-sodium citrate buffer; citrátový solný pufr
TSG	tumor suppressor genes – nádorový supresorový gen
U	uzlina
WHO	World Health Organization - Světová zdravotnická organizace