

**ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI**  
**FAKULTA PEDAGOGICKÁ**  
**CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY**

**PŘÍNOS STANOVENÍ KARYOTYPU CYTOGENETICKÝMI  
METODAMI U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM**  
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Lucie Holá**

*Biologie se zaměřením na vzdělávání*

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Dvořák, Ph.D.

**Plzeň, 2023**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 26. dubna 2023

.....  
vlastnoruční podpis

### Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. RNDr. Pavlu Dvořákovi, Ph.D. za ochotu, vstřícný přístup, trpělivost, odbornou pomoc a cenné rady při vypracovávání této práce.

## OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	3
ÚVOD .....	5
1 CYTOGENETIKA .....	6
1.1 CHROMOSOMY .....	6
1.1.1 Stavba chromosomů .....	6
1.1.2 Karyotyp člověka .....	7
1.1.3 Chromosomové aberace .....	8
1.2 CYTOGENETICKÉ LABORATORNÍ METODY .....	10
1.2.1 Příprava preparátu .....	10
1.2.2 Barvení preparátu .....	10
1.2.3 Metoda FISH .....	12
1.2.4 M-FISH .....	12
1.2.5 Metoda CGH .....	13
1.2.6 Array CGH .....	13
2 CYTOGENETICKÁ NOMENKLATURA ISCN .....	14
2.1 PRAVIDLA ZÁPISU CHROMOSOMŮ .....	15
2.1.1 Metoda HRT .....	16
2.1.2 Zkratky .....	16
2.1.3 Označování aberací .....	18
2.1.3.1 Obecná pravidla .....	18
2.1.3.2 Zápis numerických aberací .....	19
2.1.3.3 Zápis strukturních aberací .....	19
2.1.3.4 Systémy pro zapisování strukturních aberací .....	20
2.2 ZÁPIS VÝSLEDKŮ METODY <i>IN SITU</i> HYBRIDIZACE .....	21
2.2.1 Zápis <i>in situ</i> hybridizace u profázních a metafázních chromosomů .....	21
2.2.2 Zápis subtelomerické <i>in situ</i> hybridizace u metafázních chromosomů .....	22
2.2.3 Zápis jaderné <i>in situ</i> hybridizace a hybridizace interfázních chromosomů .....	22
2.2.4 Komparativní genomová hybridizace (CGH) .....	22
3 NÁDOROVÁ CYTOGENETIKA .....	23
3.1 NÁDOROVÉ BUŇKY .....	24
3.1.1 Onkogeny a antionkogeny .....	24
3.1.2 Karcinogeny .....	25
3.2 VYŠETŘOVÁNÍ CHROMOSOMŮ MALIGNÍCH NÁDORŮ .....	25
3.2.1 Vyšetření kostní dřeně .....	25
3.2.2 Vyšetření periferní krve .....	26
3.2.2.1 Solidní tumory .....	26
4 MNOHOČETNÝ MYELOM .....	27
4.1 VZNIK ONEMOCNĚNÍ .....	27
4.1.1 B lymfocyty .....	27
4.1.2 Imunoglobuliny .....	28
4.1.3 Cytokiny .....	28
4.2 PŘÍZNAKY ONEMOCNĚNÍ .....	29
4.3 DALŠÍ FORMY MYELOMU .....	29
4.4 DIAGNOSTIKA .....	30
4.4.1 Stanovení monoklonálních imunoglobulinů .....	30
4.4.2 Radiologické vyšetření .....	30

---

4.4.3	Cytogenetické vyšetření .....	31
4.5	LÉČBA .....	32
4.5.1	Konvenční léčba.....	32
4.5.2	Vysokodávkovaná terapie .....	33
4.5.3	Autologní transplantace .....	33
4.5.4	Alogenní transplantace.....	33
4.5.5	Necytostatická léčba.....	34
4.5.6	Radioterapie .....	34
4.5.7	Chirurgická terapie .....	35
4.5.8	Udržovací terapie.....	35
4.5.9	Imunoterapie .....	35
5	PRAKTICKÁ ČÁST .....	36
5.1	VÝZKUMNÉ OTÁZKY .....	36
5.2	METODIKA .....	37
5.3	VÝSLEDKY .....	37
5.3.1	Počet a věk pacientů v souboru.....	37
5.3.2	Úspěšnost vyšetření karyotypu u pacientů s MM .....	37
5.3.3	Analýza cytogenetických změn v karyotypu pacientů s prvozáchytem MM.....	38
	ZÁVĚR.....	43
	RESUMÉ .....	45
	SEZNAM LITERATURY .....	47
	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	49
	SEZNAM PŘÍLOH .....	I
	PŘÍLOHY .....	II

**SEZNAM ZKRATEK**

ASCT – autologní transplantace krvetvorných buněk (*autologous stem cell transplantation*)

CGH – komparativní genomová hybridizace

CML – chronická myeloidní leukemie

CT – počítačová tomografie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EBV – Epstein-Barův virus

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

FLC – volné lehké řetězce (*free light chains*)

HDT – vysokodávkovaná terapie (*high dose therapy*)

HRT – technika s vysokou rozlišitelností (*High-Resolution Technique*)

Ig – imunoglobulin

IMiDs – *immunomodulatory drugs*

ISCN – Mezinárodní systém pro lidskou cytogenetickou nomenklaturu (*An International System of Human Cytogenetic Nomenclature*)

ISH – *in situ* hybridizace

LPS – lipopolysacharid

mBAND – mnohobarevné pruhování

M-FISH – mnohobarevná FISH

MGUS – monoklonální gamapatie nejistého významu

MLPA – *Multilocus Ligase-dependent Probe Amplification*

MR – magnetická rezonance

MTX – metotrexát

NOR – organizátory jadérka (*nucleolus organizing region*)

PCR – polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)

PET – pozitronová emisní tomografie

PHA – phytohaemagglutinin

SCE – výměna sesterských chromatid

SKY – spektrální karyotypování (*Spectral Karyotyping*)

TPA – tetradecanoyl phorbol-13-acetát

## Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá přínosem stanovení karyotypu cytogenetickými metodami u pacientů s mnohočetným myelomem. Cílem této práce je zanalyzovat výsledky cytogenetických vyšetření pacientů v souboru poskytnutém Ústavem lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň z průběhu let 2000 až 2020 (Příloha 1). Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část.

Teoretická část je rozčleněna na 4 kapitoly, a to cytogenetiku, cytogenetickou nomenklaturu ISCN, nádorovou cytogenetiku a charakteristiku mnohočetného myelomu. Kapitoly cytogenetika a nádorová cytogenetika přibližují tato témata jakožto vědní obory, cytogenetická nomenklatura ISCN vysvětluje základní principy pro zápis chromosomových abnormalit a kapitola o mnohočetném myelomu se zabývá charakteristikou tohoto onemocnění, jeho diagnostikou a léčbou.

V praktické části se nachází vlastní analýza. Při ní byla získaná data nejprve seřazena a dále interpretována na základě cytogenetické nomenklatury ISCN. Jsou zde posuzovány nejčastější chromosomální změny v karyotypech pacientů, které jsou spojené s tímto onemocněním, věk pacientů, úspěšnost cytogenetických vyšetření a počet pacientů s nově se objevujícím onemocněním. Výsledky jsou srovnávány s jinými publikacemi zaměřujícími se na problematiku mnohočetného myelomu.



## 1 CYTOGENETIKA

Cytogenetika je vědní obor, který se zabývá chromosomy, jejich morfologií a funkcí. Název vychází z řeckého *cyton* – buňka a *gennaó* – plodím, rodím (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

### 1.1 CHROMOSOMY

Chromosomy jsou nukleoproteinové komplexy v buněčném jádře. Sestávají se z vláknů DNA a proteinů (histonů a nehistonových proteinů). Deoxyribonukleová kyselina a některé histony tvoří nukleohistonové vlákno, které spolu s oktamerem histonů dávají vzniknout nukleosomům. Ty se stáčí do solenoidů, z nichž je vytvořeno samotné chromatinové vlákno (Kočárek, Pánek a Novotná 2010). Nehistonové proteiny se uplatňují především při určování uspořádání vláknů.

V buňce se vyskytují dvě formy chromatinového vlákna. Prvním je euchromatin, který se vyznačuje menší barvitelností a tím, že je despiralizovaný. Tvoří oblasti s vysokou transkripční aktivitou a obsahuje většinu genů. Druhým případem je heterochromatin, který se oproti euchromatinu barví výrazněji, je kondenzovaný a nachází se v něm spíše repetitivní úseky. Heterochromatin můžeme rozlišovat na konstitutivní a fakultativní. První typ se nachází okolo centromery a je velmi variabilní, druhý zmíněný vzniká například inaktivací každého dalšího chromosomu X kromě prvního a označuje se jako Barrovo tělísko (Otová a kol. 2019).

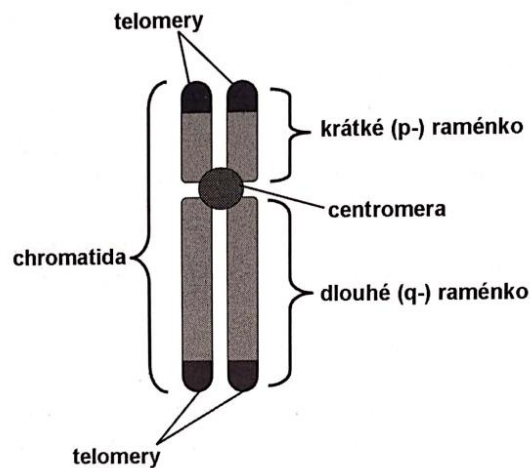
#### 1.1.1 STAVBA CHROMOSOMŮ

Chromosomové vlákno se může kondenzací během profáze buněčného dělení skládat do dobře pozorovatelného útvaru, který je tvořen dvěma raménky (Obr. 1). Krátké raménko se značí p a dlouhé raménko se značí q, na konci každého z nich je telomera. Obě raménka jsou spojena centromerou a dohromady tvoří chromatidu. Chromosom může v S fázi buněčného cyklu přecházet z jednochromatidové formy na formu se dvěma chromatidami, které jsou ale geneticky identické.

Podle poměru ramének můžeme rozřadit chromosomy na *metacentrické* se stejně dlouhými raménky, *submetacentrické* s jedním raménkem značně delším než druhým, *akrocentrické* s jedním raménkem částečně redukovaným a *telocentrické* s jedním raménkem úplně redukovaným. Poslední typ se u člověka nevyskytuje (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

Telomery jsou významné při bránění spojování různých chromosomů k sobě a rozkládání chromatid enzymy. Objevuje se u nich typická struktura opakujících se sekvencí nukleotidů TTAGGG. Při každé replikaci buňky dochází k jejich zkrácení, a díky tomu omezují životnost buňky. V buňkách se nachází telomerázy, enzymy schopné opět prodloužit telomery, ale v běžných lidských buňkách jsou neaktivní. K navození jejich aktivity může dojít při nádorových onemocněních, díky čemuž se buňky mohou dělit neomezeně.

U některých chromosomů je možné se setkat kromě centromery i se sekundárními konstrikcemi. Nazývají se tzv. organizátory jadérka (NOR – *nucleolus organizing region*). Podílejí se na utváření jadérka, obsahují geny pro ribosomální DNA a značné množství repetitiv (Otová a kol. 2019).



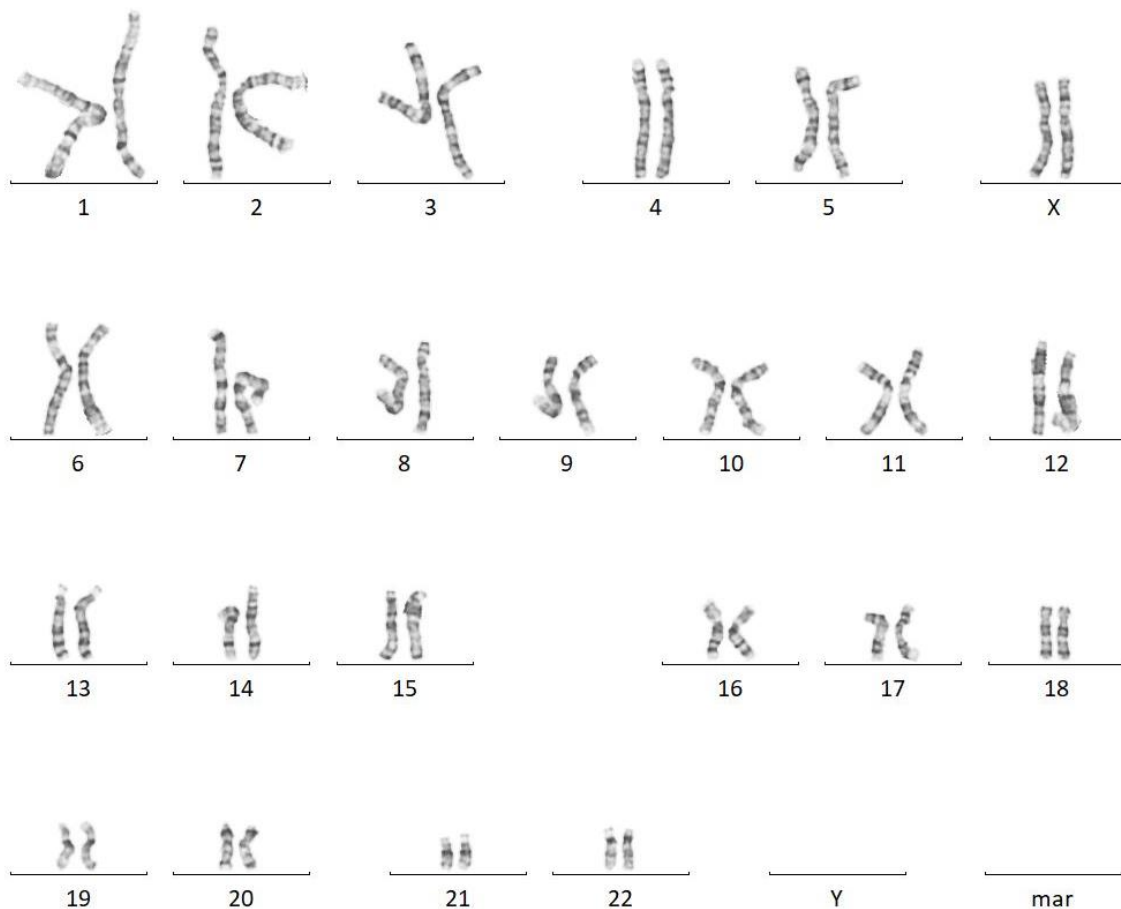
Obr. 1: Schéma dvouchromatidového chromosomu (Kočárek, Pánek a Novotná 2010)

### 1.1.2 KARYOTYP ČLOVĚKA

Každý organismus má specifický počet chromosomů, souboru chromosomů celé buňky říkáme karyotyp. Chromosomy spiralizované během metafáze buněčného cyklu můžeme pozorovat a uspořádat do karyogramů, kde je řadíme podle velikosti, pruhování a typu (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

Lidská buňka má celkem 23 párů chromosomů, z toho 22 párů autosomů (chromosomy č. 1 až č. 22) a 1 pár gonosomů (chromosomy X a Y). Lze je rozřadit do 7 podskupin (A–G). Během vyšetření karyotypu se chromosomy nejprve specificky barví

a každý pár má své typické pruhování (Obr. 2). Výsledky jsou vyhodnoceny pomocí nomenklatury ISCN a lze tak pozorovat chromosomální odchylky (Otová a kol. 2019).



Obr. 2: Normální karyotyp ženy (fotografie pořízena na ÚLG LF UK a FN Plzeň)

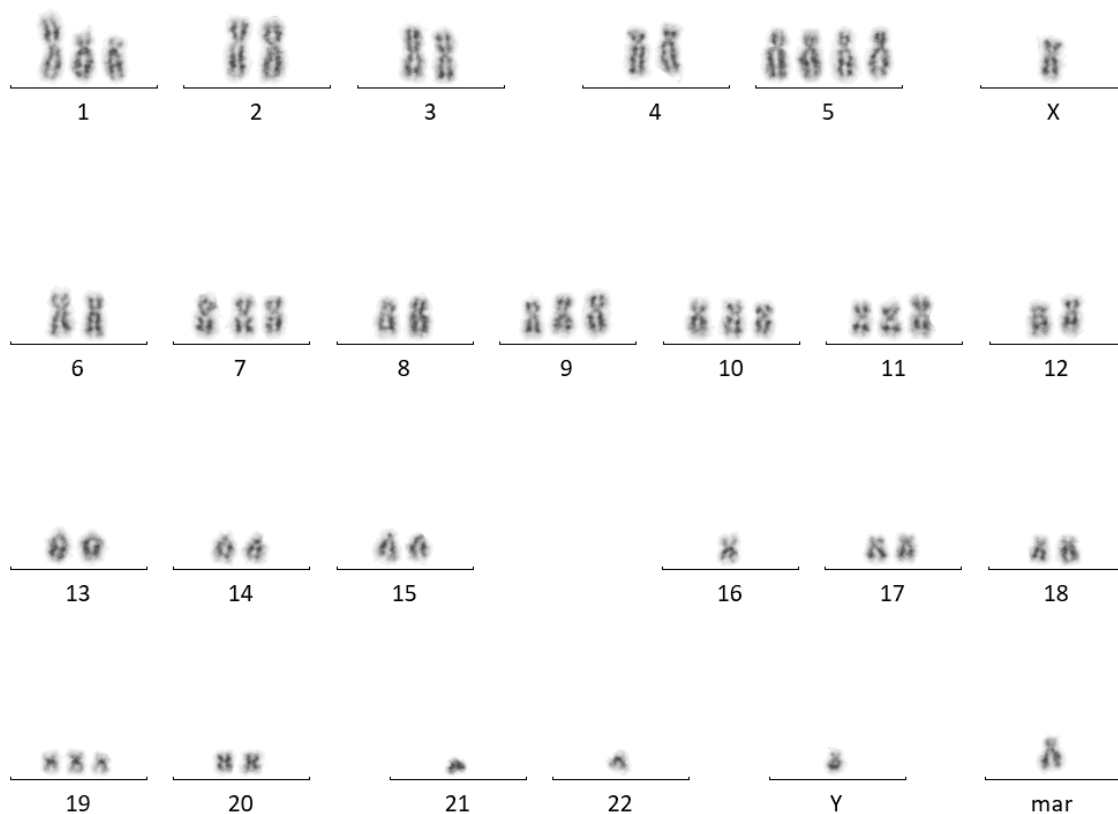
### 1.1.3 CHROMOSOMOVÉ ABERACE

Chromosomové změny neboli aberace mohou v mnohých případech způsobovat různá zdravotní postižení a syndromy. Proto jsou důležitá cytogenetická vyšetření, která často mohou tento typ poruch odhalit (Obr. 3). Abnormality chromosomů můžeme dělit na numerické a strukturální (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

Numerické aberace vznikají při narušení počtu chromosomů během buněčného dělení. Můžeme se setkat např. s aneuploidií, kdy dochází ke změně počtu jednotlivých chromosomů. Při ztrátě chromosomu jde o monosomii, při přebývání o polysomii (trisomie, tetrasomie...). Tyto změny většinou vznikají v důsledku chybného rozchodu chromosomů či chromatid při jaderném dělení. Příkladem syndromů způsobených těmito aberacemi jsou Downův syndrom (trisomie 21. chromosomu) nebo Turnerův syndrom (monosomie chromosomu X). V jiných případech může dojít ke zmnožení počtu celé chromosomové

sady, taková mutace se nazývá polyploidie. Vznikají tak například triploidie ( $3n$ ) či tetraploidie ( $4n$ ).

Při strukturálních aberacích se narušuje struktura chromosomu a láme se jeho určitá část, která je nestabilní a má tendenci se opět napojit. Rozdělit je lze do dvou skupin. První jsou aberace balancované, při nichž nedochází ke ztrátě ani přebývání genetického materiálu, zatímco u nebalancovaného typu dochází ke změně množství DNA. Ke strukturálním odchylkám může docházet vlivem mutagenů, ale i samovolně. Při těchto mutacích může docházet k několika typům změn ve struktuře. Jednou z možností je delece, kdy se úsek chromosomu úplně ztrácí. V jiných případech dochází k inverzi, tedy ke dvojitému zlomu, a opačnému připojení vylomeného úseku. Během translokace se přesouvá úsek mezi různými chromosomy a během inzerce je vložen úsek z cizího chromosomu. Kromě uvedených aberací existuje i mnoho dalších typů (Otová a kol. 2019).



Obr. 3: Hyperdiploidní karyotyp pacienta s MM s početními i strukturálními změnami chromosomů (fotografie pořízena na ÚLG LF UK a FN Plzeň)

## 1.2 CYTOGENETICKÉ LABORATORNÍ METODY

Pro cytogenetická vyšetření je třeba získat preparát, ve kterém jsou chromosomy ve spiralizovaném stádiu místo dlouhých rozvolněných vláken. V tomto stavu je pak možné je pozorovat v optickém mikroskopu (Otová a kol. 2019).

Základní laboratorní metodou v cytogenetice je pruhování chromosomů, během kterého dochází ke vzniku typických pruhů, jež jsou dále vyhodnocovány. Blíže se tomuto tématu věnuje kapitola 1.2.2. Významná je také hybridizace *in situ*, při níž se využívá značení chromosomů DNA-sondami. Tento postup umožnil pozorovat nedělicí se buňky a hledat složité chromosomové mutace, které se často objevují u maligních onemocnění. Postupně byly objevovány různé modifikace hybridizace *in situ*, např. komparativní genomová hybridizace nebo vícebarevná FISH (fluorescenční hybridizace *in situ*).

Kromě hybridizace *in situ* lze používat polymerázové řetězové reakce (PCR). Dnes se používají její modifikace, například fluorescenční kvantitativní PCR nebo MLPA (*Multilocus Ligase-dependent Probe Amplification*) (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

### 1.2.1 PŘÍPRAVA PREPARÁTU

Pro tvorbu cytogenetických preparátů je nutné najít vhodnou tkáň, u které větší množství buněk prochází mitózou (například buňky kostní dřeně, lymfocyty periferní krve nebo buňky choriových klků). K takovým buňkám se po kultivaci přidává kolchicin, který poškozují dělicí vřetenko. Tím se zabrání napojení spiralizovaných chromosomů k vřetenku a rozchodu chromatid. Dále se přidává hypotonický roztok (obvykle roztok KCl), díky jemuž se obsah jádra lépe rozprostře a oddálí se od sebe jednotlivé chromosomy. Preparát s chromosomy rozprostřenými po celém jádře se fixuje.

Pokud je třeba získat velmi přesné výsledky, využívá se technika s vysokou rozlišovací schopností neboli HRT (*High-Resolution Technique*), během které se provádí synchronizace dělení buněk a aplikuje se menší množství kolchicinu (Otová a kol. 2019).

### 1.2.2 BARVENÍ PREPARÁTU

Chromosomy se barví různými barvivy pro jejich snazší rozeznávání a porovnávání. Při klasickém barvení (*solid staining*) se používá Giemsa-romanowskiho barvivo, díky jemuž je možné snadno odlišit jednotlivé chromosomy, zjistit jejich počet a případné změny v jejich struktuře (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

Použitím klasického barvení se všechny chromosomy barví stejnoměrně, pokud ale chceme dosáhnout odlišení chromosomů od sebe, využívá se jiná metoda, a to pruhování (*banding*). Příslušnými barvivy během ní dochází ke zbarvení světlými a tmavými pruhy po celém chromosomu (Otová a kol. 2019).

G-pruhování (*Giemsa*) využívá působení enzymů, především trypsinu. Dále jsou preparáty barveny Giemsovým barvivem. Tmavé pruhy značí oblasti s malým počtem genů, zatímco světlé pruhy obsahují značné množství genů. Tyto pruhy jsou u každého chromosomu jedinečné a umožňují tak hledat mutace. Výhodou G-pruhování je možnost pozorování výsledků ve světelném mikroskopu, jde tak o nejméně finančně náročnou techniku.

R-pruhování (*reverse*) využívá proces částečné denaturace DNA za specifických podmínek (pH, teplota). Po obarvení Giemsovým barvivem vzniká opačný obraz než u G-pruhování. Tato metoda se v České republice nepoužívá (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

Q-pruhování (*quinacrine*) využívá barvivo chinakrin. Podle afinity použitého fluorochromu k páru nukleových bází můžeme získat rozdílné obrazy. Pokud se barvivo váže k AT pářům, výsledek se podobá G-pruhování, v případě afinity k CG pářům se pruhování podobá spíše obrazu R-pruhování (Kuglík 2000). Jde ale o metodu dnes již nepoužívanou a finančně nákladnou.

C-pruhování (*Constitutive heterochromatine banding*) se získá použitím Giemsova barviva v zásaditém prostředí, docílí se tak především vybarvení konstitutivního heterochromatinu. Díky velké variabilitě ve velikosti vzniklých pruhů se dříve metoda C-pruhování používala při testech otcovství.

Ag-NOR barvení (*silver staining*) využívá jako barvivo roztok dusičnanu stříbrného a zvýrazňuje oblasti NOR (organizátorů jadérka), takže se obarvují hlavně krátká raménka akrocentrických chromosomů (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

Při N-pruhování se extrahuje DNA a obarvuje se roztokem Giemsova barviva. Vznikající pruhy značí organizátory jadérka, od Ag-NOR barvení se ale liší intenzitou (Kuglík 2000).

Pro zjišťování působení mutagenů se volí metoda výměny sesterských chromatid (SCE). Dochází zde k výměně úseku DNA mezi chromatidami téhož chromosomu. Během

tohoto vyšetření se mezi buněčným dělením přidává bromdeoxyuridin do nově vzniklé chromatidy, která se díky tomu barví roztokem Giemsova barviva méně než chromatida původní (Otová a kol. 2019).

### 1.2.3 METODA FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je založena na denaturaci vyšetřované DNA, ke které se přidává sonda. Jako sonda se využívá jednovláknová DNA s navázaným fluorochromem. Příslušné dvě molekuly DNA se následně během hybridizace spojí na základě komplementarity vláken a výsledek je pozorován ve fluorescenčním mikroskopu. Výhodou oproti klasickým pruhovacím metodám je, že FISH lze provádět i u nedělících se buněk.

Jako sonda se označuje uměle vytvořený úsek DNA komplementární k vyšetřovanému úseku chromosomu. Existuje několik typů sond vhodných pro tuto metodu, konkrétní typ se volí dle potřeby. Sondy můžeme dělit na centromerické, lokus-specifické a malovací. První typ používá repetitivní sekvence z oblasti primární konstrikce. Jsou schopné rychle a poměrně snadno odhalit numerické aberace, a proto se často používají při prenatalních vyšetřeních plodu k odhalení nejčastějších postižení způsobených aneuploidii. Lokus-specifické sondy se navazují k jednomu určitému lokusu na chromosomu a odhalují naopak aberace strukturální. Podle oblasti navázání je možné tento typ sond dále dělit na telomerické, které se vážou ke všem telomerám, a subtelomerické připojující se jen k určité subtelomerické oblasti. Posledním typem jsou sondy malovací. Ty jsou tvořeny směsí úlomků DNA specifického chromosomu. Směs sond označuje celý chromosom a lze tak odhalit například translokační nebo inzerční mutace. Malovací sondy jako jediné nelze použít na jakékoli chromosomy, ale pouze na metafázické (Otová a kol. 2019).

### 1.2.4 M-FISH

Mnohobarevná FISH (M-FISH, *multicolour FISH*) je modifikací metody FISH, během které se vyšetřuje celý genom zároveň pomocí 5 různých fluorochromů na přítomnost složitých strukturálních přestaveb. Díky kombinaci různých fluorochromů vzniká dostatečný počet sond pro odlišení všech chromosomů. Fluorescenční mikroskop musí být vybaven úzkopásmými filtry pro každou sondu. Výsledný obraz vytváří počítačový program složením všech snímků a vyhodnocením obrazů. Nejprínosnější je tato metoda pro

onkocytogenetiku při vyšetřování nádorů, neboť v nich dochází k velkému množství přestaveb současně (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

Tato metoda se používá i při mnohobarevném pruhování mBAND (*multicolour banding*), u které podrobně sledujeme barevně pruhovaný jeden chromosom. Malovací sondy pro toto vyšetření jsou komplementární jen k určitému úseku na chromosomu (Otová a kol. 2019).

Metoda SKY (*Spectral Karyotyping*) je také modifikací metody M-FISH. Využívá stejný princip sond, rozdíl je ovšem v mikroskopu, který snímá výsledky (Kočárek, Pánek a Novotná 2010). Počítačový program měří spektra jednotlivých chromosomových párů a přiděluje jim stanovené barvy, tento výsledek lze pak analyzovat (Michalová 1999).

### **1.2.5 METODA CGH**

Komparativní genomová hybridizace (CGH, *Comparative genome hybridisation*) slouží ke srovnání genomů a odhalování nebalancovaných odchylek u všech chromosomů zároveň. Největší uplatnění nachází při vyšetřování nádorů, ale lze ji použít i při prenatalních vyšetřeních (Otová a kol. 2019).

I tato metoda funguje na bázi hybridizace, ale ke kontrolním metafázickým chromosomům přidáváme dvě DNA opatřené odlišnými fluorochromy ve stejném poměru. Jako sondy se zde využívají DNA vyšetřovaného vzorku a DNA zdravého jedince s fluorochromy. Během hybridizace sledujeme změnu poměru zbarvení u všech chromosomů. Pokud převládá hybridizace s nádorovou DNA, je v oblasti zmnožení, a naopak pokud se objevuje více komplementarity s kontrolní DNA, v oblastech se vyskytují delece (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).

### **1.2.6 ARRAY CGH**

Array CGH je čipová metoda odvozená od chromosomové CGH. Místo hybridizace s normálními chromosomy jako u CGH se zde sondy přidávají k velkému množství krátkých úseků DNA na mřížce. Metoda umožňuje přesnější identifikaci delecí a amplifikací u velkého množství genomu zároveň (Otová a kol. 2019).

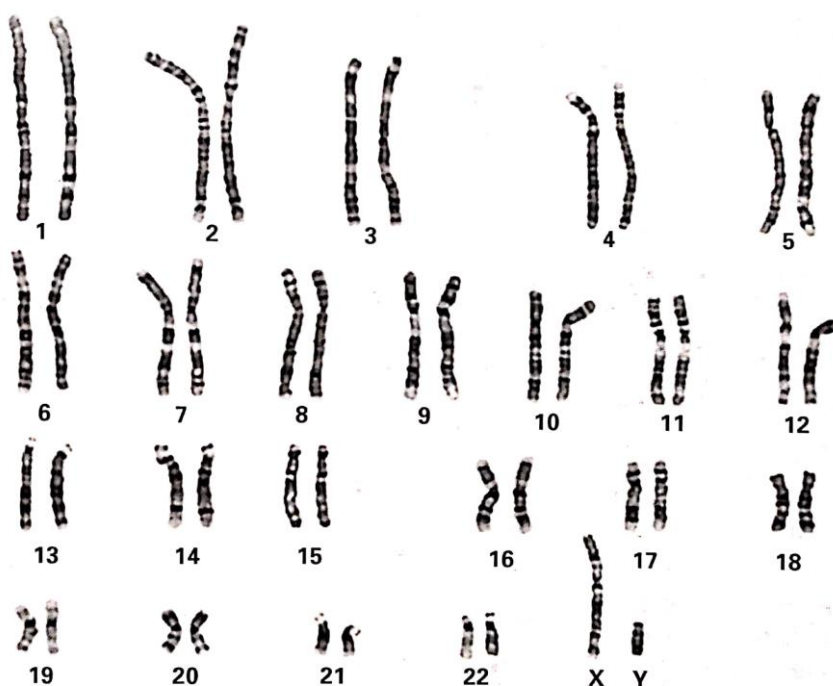


## 2 CYTOGENETICKÁ NOMENKLATURA ISCN

Mezinárodní systém pro lidskou cytogenetickou nomenklaturu (ISCN, *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) je celosvětově uznávaný způsob popisu a vyhodnocování chromosomů na základě jejich pruhování. Poprvé byl sestaven v Paříži v roce 1971, ale od té doby prošel mnoha úpravami. Nejnovější verze pochází z roku 2020.

Chromosomy se řadí dle velikosti od největšího po nejmenší. Pokud jde o autosomy, jsou jim přiřazována čísla od 1 do 22, jako poslední se uvádí pár gonosomů a značí se XX u ženy, XY v případě muže (Obr. 4).

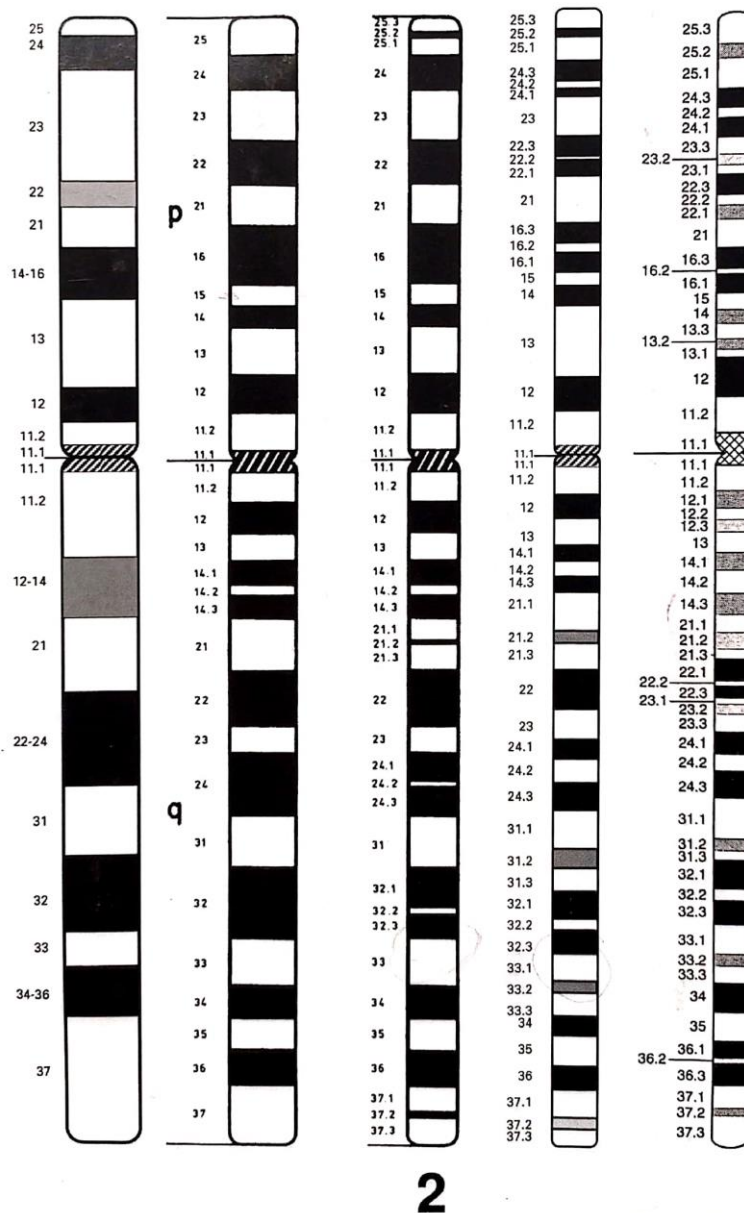
Na základě velikosti se chromosomy dají dělit do 7 skupin značených písmeny A–G. Skupina A zahrnuje tři největší *metacentrické* páry (1.–3. pár). Ve skupině B nacházíme dva největší *submetacentrické* páry (4. a 5. pár). Do skupiny C se řadí středně velké *submetacentrické* nebo *metacentrické* chromosomy (6.–12. pár) a chromosom X. Skupina D se sestává z *akrocentrických* chromosomů se satelity (13.–15. pár). Ve skupině E jsou poměrně krátké *metacentrické* a *submetacentrické* páry (16.–18. pár). Ve skupině F se nachází dva páry krátkých *metacentrických* chromosomů (19. a 20. pár). Skupina G obsahuje krátké *akrocentrické* páry se satelity (21. a 22. pár) a chromosom Y (Kuglík 2000).



Obr. 4: G-pruhování lidského karyotypu (Shaffer a Tommerup 2005)

## 2.1 PRAVIDLA ZÁPISU CHROMOSOMŮ

Každé z ramen chromosomu (p i q) se dělí na oblasti, ty se dále rozdělují na pruhy odlišené intenzitou zbarvení. Díky metodě HRT bylo možné další rozlišení pruhů na subpruhy. Všechny části jsou popisovány římskými číslicemi ve směru od centromery k telomerám (Obr. 5).



Obr. 5: Idiogram G-pruhování normálního lidského chromosomu v různých stupních rozlišení (300, 400, 550, 700 a 850 pruhů) (Shaffer a Tommerup 2005)

Pokud označujeme konkrétní pruh, musíme uvést 4 informace. Jako první zapíšeme číslo příslušného chromosomu, dále písmeno raménka, číslo oblasti, a nakonec číslo pruhu.

Při značení subpruhu se jeho číslo uvádí za desetinnou tečku. Například 1. subpruh 4. pruhu v oblasti 3 na q raménku autosomu 7 se zapíše jako 7q34.1 (Kuglík 2000).

### 2.1.1 METODA HRT

V roce 1981 byla cytogenetická nomenklatura speciálně upravena pro potřeby metody HRT (*High-Resolution Technique*), která se aplikuje na profázní a prometafázní chromosomy, oproti standardním metodám používaných na metafázních chromosomech.

Metoda HRT se dá použít na chromosomy v různých stádiích buněčného cyklu (profázní, prometafázní nebo interfázní). Díky různému stádiu kondenzace těchto chromosomů můžeme získat odlišné množství pruhů, obvykle je možné rozlišit 300, 400, 550, 700 nebo 850 pruhů (Shaffer a Tommerup 2005).

### 2.1.2 ZKRATKY

Pro snazší zápis abnormalit a mutací byl sestaven mezinárodní systém zkratek, z nichž některé jsou zde uvedeny (Kuglík 2000). Pokud se v zápisu objevuje víc než jen jedna abnormalita, zapisují se zkratky za sebou a jsou odděleny pouze mezerou (Shaffer a Tommerup 2005).

add – nadbytečný materiál neznámého původu

b – zlom

< > – závorky označující ploidii

[ ] – závorky označující počet buněk

cen – centromera

chr – chromosom

cht – chromatida

(:) – místo zlomu

::) – místo zlomu a spojení

del – delece

de novo (dn) – nezděděná chromosomová aberace

der – odvozený chromosom

dic – dicentrik

- dup – duplikace
- e – výměna
- fra – fragilní místo
- h – heterochromatin, konstitutivní
- hsr – homogenně se barvící oblast
- i – izochromosomy
- inc – nekompletní karyotyp
- ins – inzerce
- inv – inverze
- mar – markerový chromosom
- mat – mateřského původu
- min – drobný acentrický fragment
- (-) – ztráta
- (×) – mnohonásobné kopie pozměněného chromosomu
- or – alternativní vysvětlení
- p – krátké raménko chromosomu
- pat – otcovského původu
- Ph – Filadelfský chromosom
- (+) – přírůstek, získání
- q – dlouhé raménko chromosomu
- (?) – sporná identifikace
- r – kruhový chromosom
- rea – znovuspojení
- rec – rekombinantní chromosom
- s – satelit
- sce – sesterská chromatidová výměna

sct – sekundární konstriktce

t – translokace

tel – telomera

ter – terminální

### 2.1.3 OZNAČOVÁNÍ ABERACÍ

Při zápisu karyotypu uvádíme celkový počet chromosomů a za čárku bez mezery píšeme typ gonosomálního páru. Zápis u zdravého jedince je pak 46,XY u muže a 46,XX u ženy (Kuglík 2000).

#### 2.1.3.1 Obecná pravidla

V případě mutací na jednom chromosomu se jeho číslo uvádí v kulatých závorkách za zkratkou dané aberace. Při zápisu vícerych chromosomových aberací nejprve uvádíme změny gonosomů (X má přednost před Y chromosomem), poté změny autosomálních chromosomů v jejich vzestupném pořadí a oddělené čárkou. Numerické aberace mají přednost před strukturními. Pokud se objeví více strukturních aberací zároveň, uvádíme je v abecedním pořadí. Kruhové a markerové chromosomy se zapisují jako poslední.

Pokud se změna týká více chromosomů, oddělují se jejich čísla v závorce středníkem (například t(3;8)). Výjimku z tohoto pravidla tvoří případ, kdy odlomená část jednoho chromosomu je inzertována v místě zlomu druhého chromosomu. V takovém případě se jako první uvádí ten chromosom, ke kterému se zlom připojil (např. ins(8;6)).

U případů sporné identifikace se používá otazník (?) před nejistým údajem. Ve spojitosti s tímto se může objevovat i „or“, pokud je uvedena alternativní interpretace. Symbol přibližně (~) označuje určitý interval a používá se, pokud nelze určit přesnou polohu zlomu, ale jen přibližnou oblast jeho výskytu. Pokud kvůli špatné kvalitě chromosomů není možné vytvořit kompletní karyotyp, používá se zkratka „inc“ oddělená čárkou na konci zápisu.

Změna délky heterochromatinu nebo satelitu se vyjadřuje znaménkem plus (+) nebo minus (–) za symbolem heterochromatinu (h) nebo satelitu (s), aby se tak tyto případy daly odlišit od změn v délce raménka chromosomu.

Pokud je znám původ mutovaného chromosomu, připisuje se bez mezery za popis aberace značka mat (mateřského původu) nebo pat (otcovského původu). Změny nezděděné od rodičů se označují (dn) „de novo“ (Shaffer a Tommerup 2005).

### 2.1.3.2 Zápisy numerických aberací

U numerických aberací se ztráta autosomu označuje znaménkem minus (–) a přebývající autosom znaménkem plus (+) před jeho číslem. Pokud je plus nebo minus za symbolem raménka, značí změnu jeho délky (např. 6p+) (Shaffer a Tommerup 2005). U vrozených početních změn gonosomů se mutace vyjadřuje připsáním daného X nebo Y, popř. jejich vynecháním (Kuglík 2000). U nádorových karyotypů se užívá znaménka (+) či (–) v souvislosti s gonosomy pro odlišení případů získaných nádorových změn.

Znaménko krát (×) označuje mnohonásobné kopie u chromosomů s aberacemi, nepoužívá se ovšem pro zmnožené normální chromosomy.

Ploidie se zapisuje do špičatých závorek (< >) za počet chromosomů. Všechny početní změny se dále vyjadřují ve vztahu k určité ploidii (např. u diploidie ke 46) (Shaffer a Tommerup 2005).

### 2.1.3.3 Zápisy strukturních aberací

Strukturní chromosomové abnormality se zapisují pomocí výše uvedených zkratk. Číslo chromosomu, na kterém se mutace objevuje, se uvádí v závorce za příslušnou zkratkou. V případě mutací zahrnujících více chromosomů se jejich čísla oddělují středníkem a ve vzestupném pořadí, gonosomy se uvádí jako první. Pokud je normální chromosom nahrazen zmutovaným, ztráta normálního chromosomu se nezapisuje zvlášť a do karyotypu se promítne pouze pozměněný chromosom (Shaffer a Tommerup 2005).

Místo vzniku abnormality se zapisuje do další kulaté závorky pomocí čísla pruhu. I v tomto případě se dvě místa zlomu oddělují středníkem a pokud v zápisu středník chybí, obě přestavby se nacházejí na tomtéž chromosomu (Kuglík 2000). Jako první se uvádí zlom na kratším raménku, až poté se zapisuje změna na delším raménku. V situaci, kdy oba zlomy jsou na stejném raménku, jsou pruhy zapsány ve vzestupném pořadí.

Derivovaný chromosom (der) vzniká strukturní přestavbou zahrnující více chromosomů nebo více aberací v rámci jednoho chromosomu, ale centromera musí být bez změn. Oproti tomu rekombinantní chromosom (rec) vzniká crossing-overem při meiotickém

dělení. Označení Filadelfský chromosom je vyhrazeno pro popisování derivovaného chromosomu 22, který vzniká translokací  $t(9;22)(q34;q11.2)$ .

Markerové chromosomy (mar) jsou strukturně pozměněné chromosomy, u kterých není možné identifikovat žádnou část (pokud by bylo možné identifikovat nějakou část, jde o derivovaný chromosom, ne markerový). Při zápisu karyotypu se před zkratku umísťuje plus (+). Pokud se objevuje více markerových chromosomů, rozlišují se připsáním čísla za značku (např. mar1 a mar2). Mnohočetné kopie markerového chromosomu se značí symbolem pro násobení (např. mar1 x 3 atd.).

Výskyt dvou a více kopií aberovaného chromosomu se zapisuje znaménkem krát ( $\times$ ) a číslem označující příslušný počet kopií za zápisem abnormalit. Toto značení se ale nepoužívá pro zmnožení počtu normálních chromosomů (Shaffer a Tommerup 2005).

#### 2.1.3.4 Systémy pro zapisování strukturních aberací

Pro zápis karyotypu u strukturních aberací je možné používat dva systémy, a to krátký a detailní.

U krátkého systému se zapisuje typ přestavby a v závorkách jsou specifikována místa zlomů (oblasti a pruhy). Tento způsob zápisu poskytuje informace o všech pruzích, které jsou v aberaci zapojeny. U složitějších mutací je vhodnější ovšem používat detailní systém, protože krátký systém nemůže dostatečně popsat změny. Je možné použít kombinaci obou způsobů.

Detailní systém nejenže popisuje typ změny, ale i definuje složení pruhů v dané aberaci. V tomto systému se využívají další značky umožňující přesnější popis. Dvojtečka (:) značí zlom na chromosomu a dvojitá dvojtečka (::) znamená zlom a spojení. Pro znázornění od–do se používají šipky ( $\rightarrow$  nebo  $\rightarrow$ ). Konec raménka zapisujeme pomocí písmene příslušného raménka a značkou ter (např. qter), pro centromeru se používá značka „cen“.

Zápis karyotypu pomocí krátkého systému může vypadat například takto 46,XX,ins(3)(p15q21q32) a zápis stejného karyotypu pomocí detailního systému by vypadal takto 46,XX,ins(3)(pter $\rightarrow$ p15::q32 $\rightarrow$ q21::p15 $\rightarrow$ q21::q32 $\rightarrow$ qter) (Shaffer a Tommerup 2005).

## 2.2 ZÁPIS VÝSLEDKŮ METODY *IN SITU* HYBRIDIZACE

Pro hybridizaci *in situ* byla zavedena speciální cytogenetická nomenklatura specifická pro její výsledky. Můžeme se setkat s těmito zkratkami (Shaffer a Tommerup 2005).

(+) – přítomný signál

(-) – chybějící signál

++ – zdvojený signál

. – odděluje výsledky cytogenetických pozorování od výsledků hybridizace *in situ*

; – odděluje sondy na různých chromosomech

amp – amplifikovaný signál

con – spojené signály

dim – snížená intenzita signálu

enh – zvýšená intenzita signálu

ish – *in situ* hybridizace (u profázních nebo prometafázních chromosomů dělících se buněk)

fish – fluorescenční *in situ* hybridizace

mv – přemístěný signál

nuc/nucish – jaderná nebo interfázní ISH

sep – oddělené signály

subtel – subtelomerický

wcp – celochromosomová malba

### 2.2.1 ZÁPIS *IN SITU* HYBRIDIZACE U PROFÁZNÍCH A METAFÁZNÍCH CHROMOSOMŮ

Pokud je vzorek vyšetřován klasickými cytogenetickými metodami a *in situ* hybridizací (ISH) zároveň, uvádí se výsledky ISH jako druhé a za zkratkou ish, oddělenou mezerou a tečkou (Kuglík 2000).

U strukturně změněných chromosomů se za „ish“ zapisuje značka strukturní aberace, v závorce číslo chromosomu, v další závorce místa zlomů a v následující závorce se uvádí



lokusy, na kterých byly sondy použity. Lokus se označuje velkými písmeny, je následován symbolem (+), pokud je přítomen nebo symbolem (-), pokud chybí. Jednotlivé záznamy o lokusech se oddělují čárkou.

V případě, že byl vyšetřován normální chromosom, za zkratkou ish se bez závorek zapíše číslo chromosomu, oblasti, pruhu a případně subpruhu, který byl testován. V následující závorce se uvádí zkoumaný lokus, znaménko násobení ( $\times$ ) a počet zaznamenaných signálů (Shaffer a Tommerup 2005).

### **2.2.2 ZÁPIS SUBTELOMERICKÉ *IN SITU* HYBRIDIZACE U METAFÁZNÍCH CHROMOSOMŮ**

U subtelomerické FISH dochází zároveň k hybridizaci všech 41 unikátních konců chromosomů. Pro zápis je dostačující krátký systém (Shaffer a Tommerup 2005).

### **2.2.3 ZÁPIS JADERNÉ *IN SITU* HYBRIDIZACE A HYBRIDIZACE INTERFÁZNÍCH CHROMOSOMŮ**

Výsledky jsou zapisovány za zkratkou nuc ish a do závorky se uvádí označení lokusu, jednotlivé lokusy se oddělují čárkou. Znaménkem krát ( $\times$ ) a číslem znázorňujeme počet zaznamenaných signálů.

V případě použití více sond na stejném chromosomu se jejich pořadí uvádí od konce p raménka po konec q raménka. Pokud je testováno více lokusů na různých chromosomech, nejprve se zapisují výsledky gonosomů a za nimi výsledky autosomů ve vzestupném pořadí. U vyšetření nádorů se na konci zápisu v hranatých závorkách uvádí i počet testovaných buněk. V případě, že se provádí metafázní i interfázní FISH zároveň, se jejich výsledky píšou každý na vlastní řádek (Shaffer a Tommerup 2005).

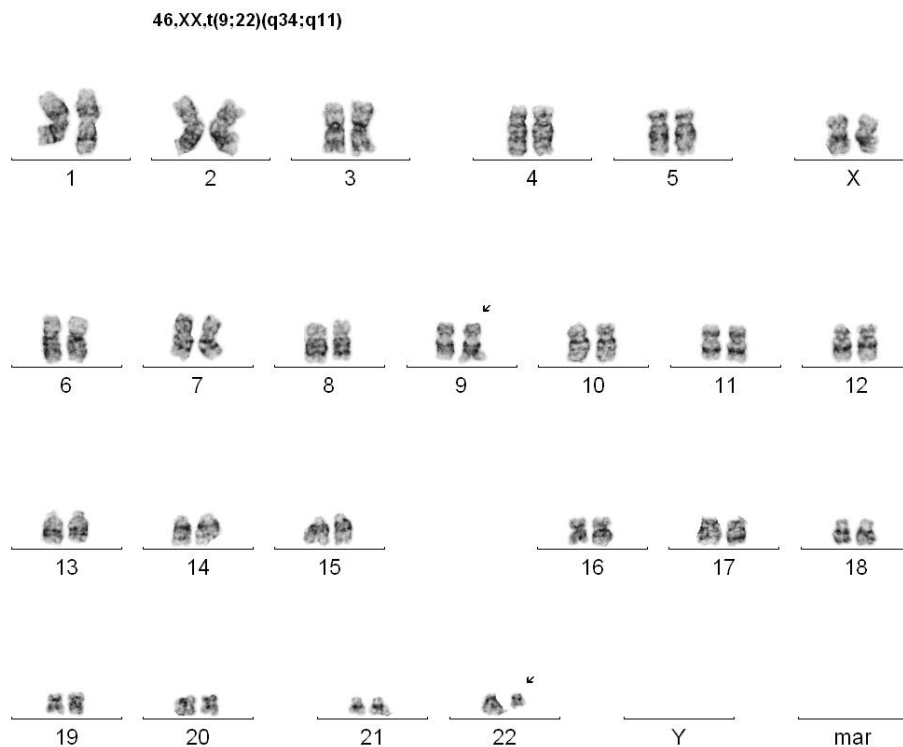
### **2.2.4 KOMPARATIVNÍ GENOMOVÁ HYBRIDIZACE (CGH)**

Během komparativní genomové hybridizace (CGH) dochází zároveň k hybridizaci DNA testovaných chromosomů a kontrolní DNA z buňky, u níž známe karyotyp. Každý ze vzorků se označí odlišně a je hybridizován s normálními referenčními metafázními chromosomy. Touto metodou je možné zjistit početní a nebalancované změny (Shaffer a Tommerup 2005).

### 3 NÁDOROVÁ CYTOGENETIKA

Nádorová cytogenetika neboli onkocytogenetika je podoborem cytogenetiky, který studuje chromosomové aberace u nádorů. V nádorových buňkách se jedná především o odchylky získané, nikoliv vrozené. Nádor je tvořen většinou různorodými buňkami i přes to, že primárně pocházejí ze stejné počáteční buňky, a děje se tak v důsledku nestability nádorových buněk. Celý karyotyp tak i nadále není během jednotlivých dělení buněk stabilní.

Průlomový pro nádorovou cytogenetiku byl objev filadelfského (Ph) chromosomu u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML). Tento aberantní chromosom se vyskytuje specificky u CML a vzniká reciprokou translokací mezi 9. a 22. chromosomem (Obr. 6). Na základě tohoto objevu se zintenzivnil výzkum maligních buněk a předpokládalo se, že každé nádorové onemocnění má nějaký typický cytogenetický marker. Ačkoli pak byla objevena řada chromosomových změn typických pro určité typy nádorů, tento předpoklad se ale zcela nepotvrdil.



Obr. 6: Karyotyp pacienta s chronickou myeloidní leukémií a typickým filadelfským chromosomem – derivovaným chromosomem 22 (fotografie pořizena na ÚLG LF UK a FN Plzeň)

Velmi významný pro onkocytogenetiku byl dále rozvoj metod hybridizace *in situ* (např. metoda FISH) a kultivace buněk *in vitro*, díky kterým je dnes možné pozorovat změny až na molekulární úrovni (Michalová 1999).

Sledování genetických změn na různých úrovních u pacientů s nádory je klíčové pro určení typu onemocnění a jeho původu (Kočárek, Pánek a Novotná 2010). Podrobné znalosti jednotlivých nádorových onemocnění dále slouží jako podklad pro zvolení nejvhodnějšího typu terapie a stanovení prognózy (Kolář 2003).

### 3.1 NÁDOROVÉ BUŇKY

Nádorové buňky se vyznačují nekontrolovaným dělením (Michalová 1999). Nadměrné buněčné dělení je běžným procesem v organismu, který ale podléhá regulačním mechanismům. Nádor vzniká poruchou těchto mechanismů (Kolář a kol. 2003). K nádorovému bujení dochází v důsledku genetické změny v určité oblasti genů, a to buď u onkogenů nebo antionkogenů (Michalová 1999).

Pokud se buňky nedostávají do jiných orgánů a nevznikají metastázy, jde o nádor nezhoubný (benigní). V případě, že nádorové buňky prorůstají do okolních orgánů a vytváří další ložiska, vzniká nádor zhoubný (maligní) (Kolář a kol. 2003).

#### 3.1.1 ONKOGENY A ANTIONKOGENY

Onkogeny, nebo také protoonkogeny, jsou běžné geny, které se přirozeně vyskytují v buňkách a kódují proteiny podílející se na řízení buněčného růstu. Nádorové bujení je spuštěno v momentě, kdy dojde k mutaci těchto genů. Tato mutace může způsobit ztrátu schopnosti regulovat růst a dochází pak k nekontrolovanému dělení (Michalová 1999). Zmíněné geny mají tendenci působit dominantně, stačí tedy mutace jednoho chromosomu v homologním páru (Kuglík 2000). U pacientů s CML při translokaci mezi chromosomy 9 a 22 dochází k dobře popsané mutaci genů BCR a ABL a u akutní lymfatické leukemie je pozměněn onkogen MYC. Dalšími častými onkogeny mohou být například geny ERBB, PIM, MOS nebo MYB.

Antionkogeny, dnes přesněji označované jako nádorové supresorové geny, jsou také běžně přítomny v buňkách. Ke spuštění bujení ale většinou nedochází v důsledku mutace, nýbrž ztráty (delece) těchto genů (Michalová 1999). Vzhledem k tomu, že antionkogeny bývají spíše recesivní, musí dojít ke ztrátě u obou chromosomů daného páru (Kuglík 2000). Často postiženými geny bývají například gen RB1, WT1 nebo APC (Kolář a kol. 2003).

### 3.1.2 KARCINOGENY

Karcinogeny jsou látky, které mohou vyvolávat mutace, a tím pádem způsobovat nádorové bujení. Jde o látky vyskytující se v prostředí více či méně běžně. Lze je dělit na chemické (různé chemické sloučeniny, např. metylnitrosmočovina, dimethylbenzantracen nebo aflatoxin B1), fyzikální (ionizující záření jako např. částice záření  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a X, UV záření) a biologické (viry, např. Epstein-Barův virus, lidský herpetický virus 8, papovaviry nebo virus hepatitidy B) (Kolář a kol. 2003).

## 3.2 VYŠETŘOVÁNÍ CHROMOSOMŮ MALIGNÍCH NÁDORŮ

Vyšetřované vzorky by měly obsahovat nádorové (neoplastické) buňky. Obvykle se provádí odběry kostní dřeně u hematologických onemocnění nebo periferní krve v případech, kdy je vzorek kostní dřeně příliš složité získat. Vyšetřování solidních tumorů je obecně složitější než u hematologických nádorů, neboť je problematické odebrat vhodný vzorek tkáně tumoru (Michalová 1999).

### 3.2.1 VYŠETŘENÍ KOSTNÍ DŘENĚ

Odběry kostní dřeně se nejčastěji provádějí ze sternu (kosti hrudní), pro vlastní vyšetření je podmínkou především obsah dělení se schopných buněk ve vzorku. Úspěšnost u tohoto vyšetření je vysoká, udává se okolo 80 %.

Jedním ze způsobů získávání cytologických preparátů je přímá sklizeň chromosomů, kdy se čerstvě odebrané buňky převedou do růstového media. Dále se přidá heparin a kolcemid a po pár hodinách se vzorek zpracuje. Tato metoda se ukázala jako málo úspěšná (asi 50 %) a pro některé typy onemocnění nevhodná.

U leukemických buněk se často používá krátkodobá kultivace, která trvá 24–48 hodin. Používá se zde odlišné kultivační medium (nejčastěji RPMI 1640) a je nutné přidat fetální telecí sérum a antibiotika.

Pokud chceme získat větší počet prometafázních a metafázních chromosomů, je možné použít několik látek blokujících buněčný cyklus, čímž docílíme synchronizace buněčného dělení. Jednou z těchto látek je metotrexát (MTX), který blokuje buněčný cyklus v S fázi, jeho účinky lze vyrušit mediem bohatým na thymidin. U některých typů leukemií byl ale zjištěn nežádoucí účinek metotrexátu, používají se proto i jiné metody synchronizace, například použitím chladu (4 °C) (Michalová 1999).

### 3.2.2 VYŠETŘENÍ PERIFERNÍ KRVE

Vyšetření periferní krve se používá u onemocnění, během kterých se vyplavují postižené buňky do krve. Pak je možné aplikovat krátkodobou kultivaci v růstovém mediu a s antibiotiky a telecím sérem. Množství krve pro kultivaci se odvíjí od počtu přítomných leukocytů.

Pro stimulaci dělení B lymfocytů se používají různé mitogeny, např. 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetát (TPA), Epstein-Barův virus (EBV), lipopolysacharid (LPS) a protein A. Pokud chceme kultivovat T lymfocyty, používá se mitogen PHA (phytohaemagglutinin) (Michalová 1999).

#### 3.2.2.1 Solidní tumory

U solidních tumorů je možné použít různé metody s odlišným zpracováním i způsobem odběru preparátu.

Jednou z možností je vyšetření tzv. výpotku, což je tekutina vznikající při nádorovém růstu. Zpracování preparátu je snadné, komplikace vznikají až při vyhodnocení, protože některé chromosomové aberace vznikají při pozdějších děleních a nelze z toho určit původní karyotyp nádoru.

Další možností je přímá sklizeň buněk tumoru. V takovém případě je nutné odebrat vzorek, který se upraví kolagenázou a trypsinem. Poté se preparát zpracuje stejně jako buňky kostní dřeně (Michalová 1999).

## 4 MNOHOČETNÝ MYELOM

Mnohočetný myelom (angl. *multiple myeloma*) je maligní onemocnění postihující kostní dřeň a proces krvetvorby. Název vzniká odvozením od řeckého výrazu pro kostní dřeň (*myelé*) a přidáním -om. Vzhledem k tomu, že se při onemocnění vyskytuje více ložisek, používá se termín mnohočetný (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008).

První zmínky o tomto onemocnění pocházejí již z poloviny 19. století, název mnohočetný myelom byl zaveden až v roce 1873. Na přelomu 19. a 20. století se začalo nemoci věnovat více pozornosti a byl prokázán vztah s plasmatickými buňkami (plasmocyty). V průběhu 20. století byly zlepšovány diagnostické metody a způsoby léčby (Špička et al. 2005).

Mnohočetný myelom je druhé nejčastější zhoubné hematologické onemocnění a objevuje se u 3–4 osob na 100 000 (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008). Onemocnění se typicky vyskytuje u pacientů vyššího věku, průměrný věk při diagnóze je 60 let. Častěji se objevuje u mužů než u žen, asi v poměru 3 : 2. Vyšší výskyt onemocnění je u Afroameričanů, v rámci Evropy je vyšší procento nemocných v zemích severní Evropy. V České republice se počet pacientů postupně zvyšuje.

Konkrétní příčina vzniku onemocnění není známa, ale riziko propuknutí mnohočetného myelomu pravděpodobně zvyšuje rizikové prostředí (chemické, fyzikální i biologické karcinogeny) i genetické predispozice (Špička et al. 2005).

### 4.1 VZNIK ONEMOCNĚNÍ

Mnohočetný myelom vzniká genetickou aberací lymfocytu, který se dále množí. Takto vzniklé buňky se mění na buňky plasmatické produkující cytokiny. Kromě cytokinů jsou produkovány i monoklonální imunoglobuliny (Ig). Ty se mohou vázat na různá místa v organismu a způsobovat mnohé problémy (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008).

#### 4.1.1 B LYMFOCYTY

B lymfocyty vznikají diferenciací z kmenové buňky v kostní dřeni, časem se dostávají do krve a nakonec se usídlují v lymfatických orgánech, kde dozrávají. Prvotní vývoj těchto lymfocytů probíhá bez jakékoli návaznosti na antigeny a je typický přesunem genů kódujících produkci imunoglobulinů. Celý proces je kontrolován a nefunkční buňky jsou likvidovány apoptózou. Další vývoj v lymfatických orgánech je stimulován až

přítomností antigenu. V takovém případě se B lymfocyt mění buď na plasmatické buňky syntetizující imunoglobuliny nebo na paměťové buňky.

Nádorové přeměny vznikají obvykle v pozdějších fázích vývoje B lymfocytu a nejčastěji se setkáváme s maligními zralými plasmocyty. Oproti funkčním plasmatickým buňkám mají nižší sekreci imunoglobulinů, dlouhou životnost, netypické umístění v kostní dřeni a schopnost nahrazovat zdravé plasmocyty (Špička et al. 2005).

Maligní plasmocyty se vyznačují bazofilní cytoplasmou a někdy také vyšším počtem jader. V některých případech je možno pozorovat Rousselova tělíška, která se barví červeně. Celkový počet těchto plasmocytů může být v odebraném vzorku kostní dřene vyšší, než by byl počet normálních plasmatických buněk u zdravého člověka (Lexová a kol. 2000).

#### **4.1.2 IMUNOGLOBULINY**

Imunoglobuliny syntetizované B lymfocyty se skládají z několika lehkých a těžkých řetězců. Na jejich povrchu jsou vazebná místa pro antigeny (tzv. idiotypy), podle jejichž struktury je můžeme řadit do následujících skupin – IgA, IgD, IgE, IgG a IgM.

IgM je produkován při primárním setkání s antigenem, hraje důležitou roli při aktivaci komplementu a vzniku zánětu, je zakomponován jako receptor v membráně B lymfocytů. IgG je velmi podobný IgM, ale liší se afinitou. IgA je důležitý pro ochranu sliznic a IgE se podílí na aktivaci žírných buněk a ochraně proti parazitům.

Funkční plasmocyty produkují polyklonální imunoglobuliny s odlišnými idiotypy. Zmutované plasmatické buňky ale syntetizují Ig jen s jedním typem vazebného místa, tzv. monoklonální imunoglobuliny. Tyto dysfunkční plasmocyty postupně nahrazují v kostní dřeni buňky funkční a do krve se vyplavují pouze monoklonální imunoglobuliny (Špička et al. 2005).

#### **4.1.3 CYTOKINY**

Cytokiny jsou produkovány lymfocyty a tvoří síť, která umožňuje vzájemnou interakci lymfocytů. Důležité jsou také při vzniku mnohočetného myelomu, neboť ovlivňují buněčnou proliferaci a odumírání buněk. Mohou zároveň způsobovat některé komplikace jako například úbytek hmotnosti nebo zvýšení teploty (Špička et al. 2005).

## 4.2 PŘÍZNAKY ONEMOCNĚNÍ

Jedním z nejčastějších příznaků mnohočetného myelomu jsou bolesti kostí, obvykle v oblasti zad, které trvají delší dobu a zvyšují svou intenzitu. Může docházet i k různým zlomeninám bez jakékoliv vnější příčiny (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008). To je způsobeno nahromaděním maligních plasmocytů v kostní dřeni. Jejich přítomnost v dané oblasti zvyšuje aktivitu osteoklastů, a tím i intenzitu odbourávání kostní tkáně a vyplavení vápenatých iontů do krve. Pokud dochází ke zlomeninám obratlů, může se pacientova výška zmenšovat (Maisnar, Popková a Štork 2022).

Vznik monoklonálních imunoglobulinů a jejich částí může také způsobovat selhání ledvin. Při filtraci krve se zvýšeným obsahem těchto látek v ledvinách dochází k ucpávání kanálků a k přetížení resorpce látek. Imunoglobuliny se poté dostávají do moči. Důsledkem této dysfunkce je zadržování dusíkatých látek v ledvinách.

U pacientů s mnohočetným myelomem může docházet ke snížení imunity. Snižuje se produkce a omezuje se funkce B i T lymfocytů. To se projevuje zhoršeným průběhem a častějším výskytem infekčních onemocnění, především bakteriálních.

Značné množství pacientů trpí anémií, což lze pozorovat jako únavu, krvácení a poruchu srážlivosti krve. V organismu se snižuje počet krevních destiček, v některých případech dochází ke snížení počtu všech krevních buněk. Jde o důsledek produkce cytokinů, rozšíření nádoru v kostní dřeni, a tím omezení krvetvorby (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008).

V neposlední řadě může být postižena i nervová soustava. Pacient někdy pociťuje brnění končetin, sníženou citlivost nebo oslabení svěracích svalů (Maisnar, Popková a Štork 2022).

## 4.3 DALŠÍ FORMY MYELOMU

Rozvinutí vlastního mnohočetného myelomu předchází fáze MGUS (monoklonální gamapatie nejistého významu). MGUS se vyznačuje přítomností monoklonálního imunoglobulinu v krvi nebo moči u pacientů bez nádorového onemocnění (Špička et al. 2005). Tento stav ale obvykle nemá žádné projevy typické pro mnohočetný myelom a nezpůsobuje pacientovi potíže. Jeho diagnóza je proto obtížná a většinou jen náhodná.



Pokud se MGUS rozvine v mnohočetný myelom, může nastat fáze doutnajícího myelomu (*smoldering myeloma*). Tento stav lze jednoznačně diagnostikovat vyšetřením kostní dřeně nebo moči a krve. Onemocnění je ale stále asymptomatické a bývá obvykle pozorováno bez léčby.

Plasmocelulární leukémie je vzácnější a zároveň agresivnější formou mnohočetného myelomu. Typické je vyplavování maligních plasmatických buněk do periferní krve. Projevuje se stejně jako mnohočetný myelom a také jako leukémie (Maisnar, Prokopová a Štork 2022).

Jako solitární plasmocytom se označuje stav, kdy je v těle pouze jedno maligní ložisko. V některých případech se ložisko může vyskytovat i mimo kostru, nejčastěji v dýchací soustavě. Chybí zde typické projevy mnohočetného myelomu (Špička et al. 2005).

#### 4.4 DIAGNOSTIKA

Pro stanovení diagnózy mnohočetného myelomu se musí u pacienta objevovat tyto tři typické projevy – narušení kostní dřeně maligními buňkami, přítomnost monoklonálního imunoglobulinu a zvýšená úroveň odbourávání kostní tkáně. V některých postupech se jako třetí projev uvádí postižení jiných orgánů související s mnohočetným myelomem (zvýšená hladina vápenatých iontů v krvi, selhávání ledvin, anemie nebo osteolýza) (Špička et al. 2005).

##### 4.4.1 STANOVENÍ MONOKLONÁLNÍCH IMUNOGLOBULINŮ

Elektroforéza krevního séra nebo moči slouží k určení množství monoklonálních imunoglobulinů. S narůstajícím množstvím těchto imunoglobulinů je pravděpodobné, že narůstá i množství maligních plasmatických buněk (Maisnar, Popková a Štork 2022).

Nově používanou metodou s vysokou citlivostí je stanovení volných lehkých řetězců (FLC) v krevním séru. Nejde tedy přímo o důkaz imunoglobulinů, ale jen jejich části. Toto vyšetření je schopné zaznamenat změnu v jejich poměru a množství dříve než ostatní metody a umožňuje identifikovat mnohočetný myelom v raných stádiích (Adam a kol. 2007).

##### 4.4.2 RADIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Jedna z nejběžnějších metod je skiografie, která využívá rentgenové záření. Aby bylo možné s jistotou identifikovat mnohočetný myelom, musí být kostní tkáň poškozena alespoň z 50 % a ložisko musí mít v průměru 2 a více cm.

Magnetická rezonance (MR) je nejpřesnější radiodiagnostickou metodou, která je založená na zobrazení množství a poměru vody a tuku v jednotlivých orgánech těla (Špička et al. 2005). Na snímcích MR lze rozeznat zdravou a maligní kostní dřev ještě před vznikem osteolytických ložisek. Pro lepší zobrazení se používají kontrastní látky (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008). Nevýhodou je složitý výklad výsledků a možnost vyšetřit jen určitou část těla, ne však celé tělo.

Počítačová tomografie (CT) a ultrasonografie se užívají pro stanovení postižení v tělní dutině. Postiženými orgány bývají ledviny a slezina, viditelná mohou být i ložiska v kostech, především v pánvi a obratlích (Špička et al. 2005).

Pozitronová emisní tomografie (PET) využívá radioaktivně značenou látku pro zvýraznění metabolicky aktivních oblastí v těle, kterými často bývají nádory (Maisnar, Popková a Štork 2022). Umožňuje odhalovat ložiska v kosti a zároveň i případné postižení dalších orgánů (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008).

#### 4.4.3 CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ

U pacientů s mnohočetným myelomem se běžně provádí cytogenetické vyšetření kostní dřevě, které je ale až v 60 % případů neúspěšné nebo nečitelné. Asi u poloviny úspěšných vyšetření se objevují chromosomové aberace. Při použití metody FISH se četnost chromosomových odchylek ukazuje jako mnohem vyšší (až 90 %).

V karyotypech nemocných s mnohočetným myelomem se objevují početní i strukturní aberace. U značného množství pacientů se můžeme setkat se ztrátou některého z chromosomů anebo naopak přebývajícím chromosomem. Zmnožení je nejčastěji pozorováno u lichých chromosomů (3, 5, 7 atd.). Co se strukturních přestaveb týče, nejvíce se vyskytují translokace a delece. Jedny z nejběžněji zasažených oblastí během translokace jsou 14q32 a 22q11. U třetiny až poloviny vyšetření můžeme najít delecii na chromosomu 13 (del(13)q) (Špička et al. 2005). Jednou z nejčastějších přestaveb je translokace t(11,14)(q13;q32) (Lexová a kol. 2000). Mezi nejběžněji postižené onkogeny patří například geny rodiny RAS, C-MYC nebo gen retinoblastomu (Špička a Straub 2013).

S horší prognózou jsou spojovány některé translokace, například t(14;16), t(14;20) nebo t(4;14) (Špička a Straub 2013). Kromě translokací mohou být rizikové delece na chromosomu 17 (gen p53 leží v pruhu p13) nebo amplifikace pruhu q21 na 1. chromosomu (Zaoralová a kol. 2007).

Přítomnost některých typických chromosomových odchylek je důležitým diagnostickým hlediskem, může zároveň přispět k určení průběhu onemocnění a vybrání nejúčinnější léčby (Špička et al. 2005).

## 4.5 LÉČBA

Mnohočetný myelom začíná být léčen v momentě, kdy se zvyšuje hladina monoklonálního imunoglobulinu nebo se objevují typické projevy tohoto onemocnění (viz kap. 1.2 Příznaky onemocnění). Pokud je u pacienta diagnostikován MGUS nebo doutnající mnohočetný myelom, obvykle je jejich zdravotní stav jen sledován bez jiné léčby. Volba nejvhodnější léčebné metody se odvíjí od celkového zdravotního stavu pacienta.

Léčebnou odpověď lze hodnotit dle několika typů kritérií, nejčastěji se používají kritéria CLMTF nebo SWOG. Tyto dva typy od sebe odlišuje množství klesajícího monoklonálního imunoglobulinu, kdy v případě CLMTF musí klesnout hladina o polovinu, ale u SWOG až o tři čtvrtiny původní hodnoty v krevním séru (Špička et al. 2005).

Při terapii mnohočetného myelomu je léčba zaměřena na dva cíle zároveň. Jednak je třeba snižovat množství maligních buněk v kostní dřeni, což umožňuje navrácení funkčních dřevných buněk a zmírnění odbourávání kosti, druhou částí léčby je tlumení příznaků nemoci (Maisnar, Popková a Štork 2022).

### 4.5.1 KONVENČNÍ LÉČBA

Základem konvenční léčby jsou cytostatické léky a je vhodná pro pacienty, u kterých z nějakého důvodu není možné použít jiné metody. Nejběžněji se používá kombinace léků melfalanu a prednisonu (MP). Tato léčba bývá úspěšná u 50–70 % pacientů (Špička et al. 2005).

U nemocných s agresivnějšími formami mnohočetného myelomu se ukázalo jako přínosné kombinovat více cytostatických léků, neboť jejich účinek se pak dostavuje rychleji. Takovou kombinací je například VAD (vinkristin, adriamycin a dexametazon) spolu s metylprednisolonem a cyklofosfamidem, zde se účinnost uvádí asi 60–80 %.

Další alternativou je nahrazení prednisonu dexametazonem a jeho použití v kombinaci s melfalanem (MD). Tato kombinace má vyšší účinnost než klasická MP, ale u starších pacientů je spojována s častějšími vedlejšími účinky (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008).

Kromě cytostatik jsou pro léčbu mnohočetného myelomu podstatné i kortikosteroidy. Jejich hlavním účinkem je snížení množení maligních buněk a zvýšení míry jejich odumírání. Při takovém postupu je možné použít například thalidomid v kombinaci s dexametazonem (Špička et al. 2005).

#### **4.5.2 VYSOKODÁVKOVANÁ TERAPIE**

Vysokodávkovaná terapie (HDT) je typem chemoterapie, která používá pouze jeden typ léku ve vysokých dávkách. Nejběžněji používaným bývá melfalan v množství 200 mg/m<sup>2</sup>. Pro vyrovnání toxických účinků této terapie bývá současně prováděna autologní transplantace krvetvorných buněk (ASCT) (Špička et al. 2005). Vysoká dávka cytostatik totiž odstraňuje všechny buňky kostní dřeně, nejen ty maligní, a následná transplantace krvetvorných buněk umožňuje rychlé znovuoobnovení krvetvorby (Maisnar, Popková a Štork 2022).

#### **4.5.3 AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE**

Při autologní transplantaci jsou pacientovi vpravovány do těla vlastní krvetvorné buňky. Ty mohou být získávány buď z kostní dřeně anebo z periferní krve. Kromě nich se do těla opět dostávají i myelomové buňky, které mohou případně způsobit relaps onemocnění. Proto byly zkoumány různé postupy čištění, díky jimž by bylo možné snížit počet těchto maligních buněk. Žádná ze studií ale neprokázala velký přínos takového čištění a nadále se používají neupravené buňky.

Transplantace se volí spíše u mladších pacientů, obvykle do 60 nebo 65 let věku. U některých starších pacientů je také možné transplantaci provést, ale je nutné použít nižší množství léku při souběžné chemoterapii a je třeba přihlídnout k ostatním zdravotním komplikacím (Špička et al. 2005).

#### **4.5.4 ALOGENNÍ TRANSPLANTACE**

Transplantace alogenní se od autologní liší původem krvetvorných buněk. U první zmíněné se totiž používají buňky od jiného dárce, který ale musí být kompatibilní – obvykle jde o příbuznou osobu, nejčastěji sourozence. U autologní transplantace, jak již bylo popsáno výše, jsou transplantovány pacientovi vlastní buňky.

Tato metoda se prokázala jako nejúčinnější při dosahování úplného vyléčení mnohočetného myelomu. Na druhou stranu je zde vyšší riziko úmrtí po transplantaci než u pacientů po autologní transplantaci. Nejpříznivější podmínky pro provedení alogenní

transplantace jsou léčba během počátečního stádia mnohočetného myelomu a předchozí léčba jen jednou léčebnou metodou (Špička et al. 2005).

#### 4.5.5 NECYTOSTATICKÁ LÉČBA

Thalidomid a léky od něj odvozené se označují jako IMIDs (*immunomodulatory drugs*). Jejich podání vyvolává odumírání maligních buněk, které nereagují na konvenční léčbu, a zvýšení imunitní odpovědi vlastního organismu na nádor (Špička et al. 2005). V kombinaci thalidomidu s dexametazonem je účinnost léčby asi 50–70 %. U pacientů, kteří nemohou podstoupit vysokodávkovanou terapii s ASCT je možné použít kombinaci thalidomidu s MP. Problém této metody ale spočívá v komplikacích spojených s užíváním IMIDs jako například zácpy nebo oslabení svalů (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008). Thalidomid zvyšuje riziko trombózy a embolie, proto bývá součástí léčby i podávání léků na snižování srážlivosti krve (Špička et al. 2005).

Jednou z alternativ k thalidomidu je například lenalidomid. Jde o látku odvozenou od thalidomidu, ale s menšími vedlejšími a lepšími léčivými účinky. Působí totiž na buněčný cyklus myelomových buněk tím, že aktivuje supresorové geny, a vyvolá tak jejich odumírání. Zároveň napomáhá zvýšení přirozené imunity, především T lymfocytů, které začnou likvidovat maligní buňky. Dobré výsledky vykazuje v kombinaci s dexametazonem (Dimopoulos, Terpos a Niesvizky 2014).

Dalším velmi účinným lékem se ukázal bortezomib, který funguje jako inhibitor proteazomu. Jeho inhibiční účinky narušují funkci proteinů, které kontrolují buněčný cyklus a řízenou smrt buněk (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008). Pro svůj rychlý účinek se nejvíce používá u pacientů s relapsem onemocnění a u pacientů ve vyšším věku, kteří nemohou podstoupit transplantaci (Špička a Straub 2013).

#### 4.5.6 RADIOTERAPIE

Ozařování narušuje DNA buněk, čímž dochází k jejich odumírání. Obzvláště účinné je to pro rychle množící se buňky, ovlivněny jsou ale všechny buňky (Maisnar, Popková a Štokr 2022).

Ozařování může být použito jak pro jednotlivá ložiska, tak pro celé tělo. Léčba zaměřená na jedno konkrétní místo je přínosná při likvidaci solitárních a mimokostních plasmocytomů nebo při zmírňování bolestí pacienta v jednotlivých kostech. Radioterapie celého těla může být součástí přípravy pacienta pro transplantaci (Špička et al. 2005).

#### 4.5.7 CHIRURGICKÁ TERAPIE

U pacientů, kteří z nějakého důvodu (věk, zdravotní stav apod.) nemohou podstoupit operaci zajišťující zpevnění skeletu, je možné použít vnější zpevnění. K tomuto účelu se nejčastěji používají krční límce, korzety, hrudní vesty a další ortézy.

Další možností je vertebroplastika. Jde o metodu, při které se do těla obratle pod tlakem vpraví kostní cement. Ten vyplní vzniklé dutiny v kostech, a zvyšuje tak jejich pevnost (Špička et al. 2005). Obdobně funguje i kyfoplastika, ale při té se do postiženého obratle nejprve vloží balóněk, jehož nafouknutím se vytvoří dutina. Ta se poté naplní kostním cementem (Adam, Krejčí, Vorlíček a kol. 2008).

U pacientů, kteří jsou schopni podstoupit chirurgický zákrok, je možností zavést kovový implantát, kostní štěp nebo dlahu (Špička et al. 2005).

#### 4.5.8 UDRŽOVACÍ TERAPIE

Cílem udržovací terapie je prodloužení remise (bezpříznakového období) a přežití. Použití interferonu  $\alpha$  umožňuje relaps oddálit asi o 7 měsíců. U bisfosfonátů byl prokázán efekt snižující odbourávání kostní tkáně a útlum dělení maligních buněk (Špička et al. 2005).

#### 4.5.9 IMUNOTERAPIE

Imunoterapie je založená na aktivaci vlastní imunity, která kromě nově vzniklé infekce likviduje i nádorové buňky. Tohoto efektu je možné docílit stimulací pasivní i aktivní imunity.

Pasivní imunita je založená na tvorbě protilátek, které se v organismu vážou na antigeny, což vede k jejich likvidaci. Pacientovi jsou podávány specifické protilátky reagující s nádorovými antigeny. Problémem této metody je, že ne všichni pacienti s mnohočetným myelomem mají nádorové buňky s těmito antigeny, tudíž je nelze léčit touto cestou.

Neustále jsou zkoumány i protinádorové vakcíny. Pro jejich tvorbu je nutné odebrat od pacienta vzorek obsahující peptidy, které hrají roli při rozeznávání nádorových buněk T lymfocyty. Tyto peptidy jsou dále připravovány a vakcinovány zpět pacientovi, aby ovlivňovali imunitní reakci T lymfocytů v těle (Špička et al. 2005).

## 5 PRAKTICKÁ ČÁST

Hlavním cílem praktické části předkládané bakalářské práce bylo zpracovat nesourodý soubor laboratorních a klinických dat pacientů s mnohočetným myelomem (MM), jejichž vzorky byly zaslány k cytogenetické analýze do Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice v Plzni mezi lety 2000 a 2020. Analýzou zpracovaných dat jsem se snažila odpovědět na následující otázky, které přinášejí základní charakteristiku souboru a možnost jeho porovnání se soubory jiných pracovišť.

### 5.1 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

1. Kolik pacientů s mnohočetným myelomem bylo celkově zahrnuto do tohoto souboru?
2. U kolika ze všech pacientů se jednalo o nově zachycené onemocnění, tzv. prvozáchyt?
3. Jak se vyvíjel medián věku pacientů při prvozáchytu onemocnění v závislosti na hodnocených letech?
4. U jakého procenta pacientů bylo vyšetření karyotypu považováno za neúspěšné?
5. Kolik pacientů s prvozáchytem mělo normální a kolik abnormální karyotyp?
6. Lze na základě počtu chromosomů v abnormálních karyotypech vyčlenit nějaké podskupiny pacientů s MM?
7. Jaké byly nejčastější počty chromosomů v těchto podskupinách?
8. Které chromosomy nejčastěji figurovaly při početních změnách v karyotypu v jednotlivých podskupinách?
9. Které chromosomy se nejčastěji účastnily strukturních změn v karyotypu v jednotlivých podskupinách?
10. U jakého procenta pacientů v jednotlivých podskupinách bylo zachyceno současně více patologických klonů?
11. Které rozdíly na chromosomální úrovni tyto podskupiny charakterizují?

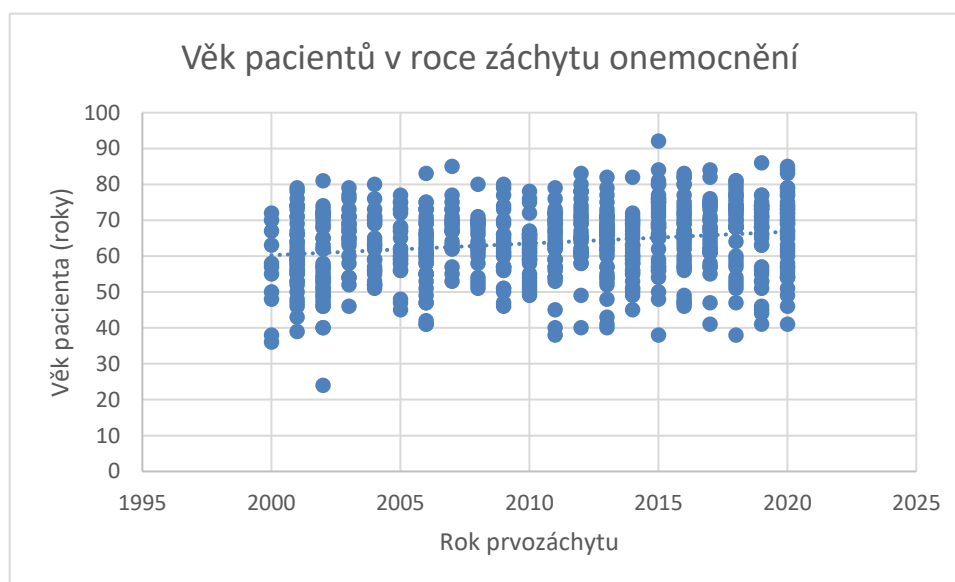
## 5.2 METODIKA

Prvním krokem bylo sestavení tabulky, do které jsem přehledným způsobem zaznamenala klinická a laboratorní data pacientů s MM. Tato práce se zaměřila na výsledky vyšetření klasické cytogenetiky, tj. stanovení karyotypu nádorových buněk metodou G-pruhování. Výsledky molekulárně cytogenetických metod (metoda FISH) do této práce zahrnutы nebyly. Na základě sestavené tabulky vznikly následující analýzy zpracovaných dat.

## 5.3 VÝSLEDKY

### 5.3.1 POČET A VĚK PACIENTŮ V SOUBORU

Vyšetření karyotypu buněk z kostní dřeně pacientů s MM byla hodnocena u 770 po sobě jdoucích pacientů, jejichž vzorky byly zaslány do laboratoře Ústavu lékařské genetiky v rozmezí let 2000 až 2020. Z toho u 673 pacientů se jednalo o tzv. prvozáchyt, tj. první vyšetření pacienta pro dané onemocnění z důvodu stanovení správné diagnózy a prognózy, ještě před zahájením případné léčby. Počet i medián věku pacientů při prvozáchytu onemocnění v našem souboru postupně rostl od 11 prvozáchytů s mediánem 57 let v roce 2000 po 40 prvozáchytů s mediánem 68 let v roce 2020 (Obr. 7).



Obr. 7: Graf znázorňující věk pacientů s prvozáchytém MM v souboru 673 pacientů

### 5.3.2 ÚSPĚŠNOST VYŠETŘENÍ KARYOTYPU U PACIENTŮ S MM

U 66 pacientů z celkového počtu 770 vyšetřených pacientů (tj. přibližně v 9 %) nebylo vyšetření karyotypu úspěšné, tj. nebyl nalezen dostatečný počet hodnotitelných mitóz



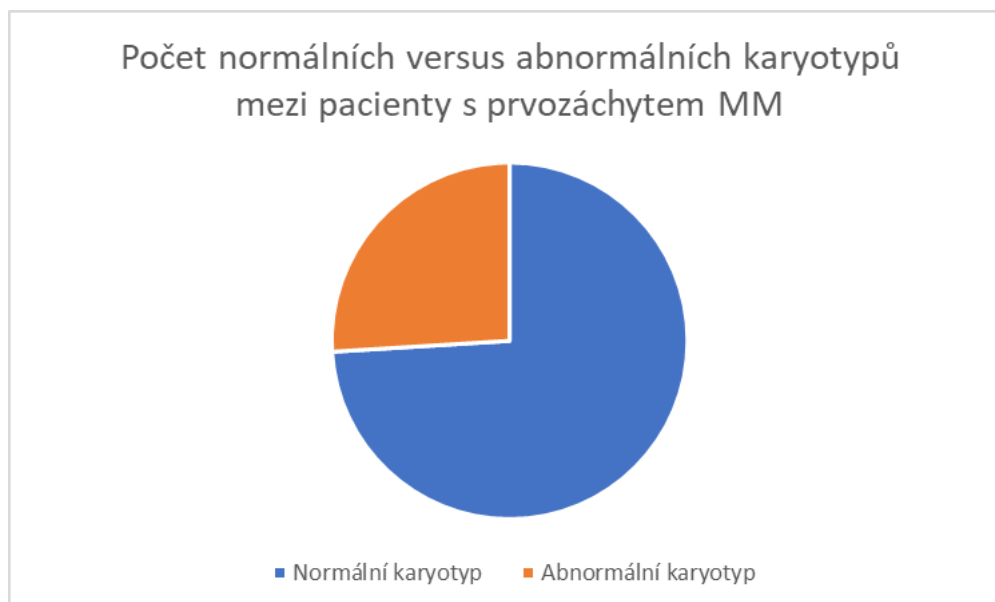
pro validní výsledek vyšetření. U 544 pacientů máme v našem souboru jedno úspěšné vyšetření karyotypu, u 123 pacientů dvě a u 37 pacientů tři a více úspěšných vyšetření dělaných v průběhu vývoje onemocnění mnohočetným myelomem (Obr. 8).



Obr. 8: Graf s přehledem úspěšnosti vyšetření karyotypu u pacientů s MM

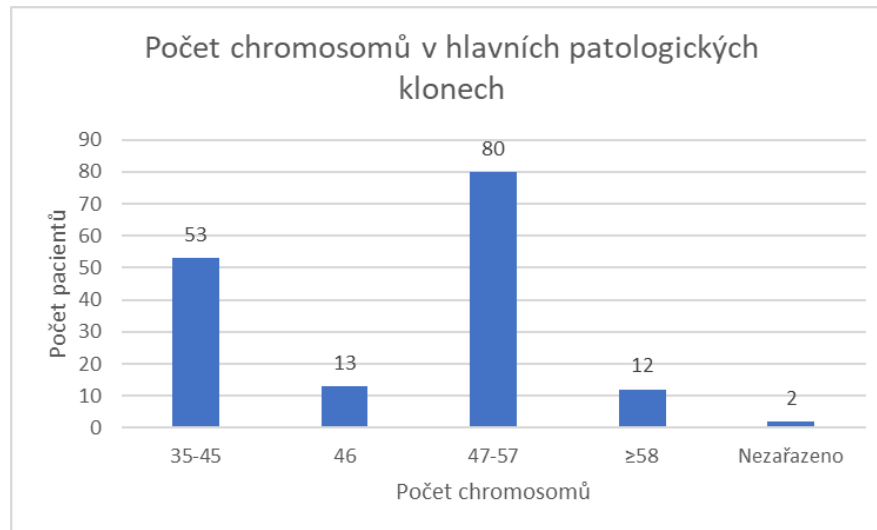
### 5.3.3 ANALÝZA CYTOGENETICKÝCH ZMĚN V KARYOTYPU PACIENTŮ S PRVOZÁCHYTEM MM

Ze 704 úspěšně vyšetřených pacientů bylo 616 prvozáchytů. U těchto pacientů s prvozáchytem MM byl nalezen abnormální karyotyp v 160 případech (26 %) a normální karyotyp ve zbývajících 456 případech (Obr. 9).



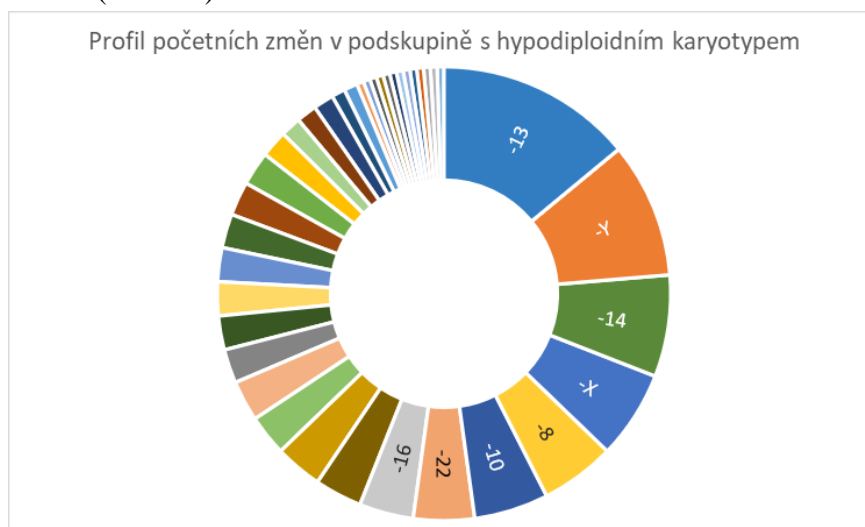
Obr. 9: Graf počtu normálních versus abnormálních karyotypů u prvozáchytů MM

Počet chromosomů v hlavních patologických klonech je zaznamenán na Obr. 10, v případech složeného (kompozitního) karyotypu se jedná o minimální počet chromosomů. Graf je rozdělen na skupiny s hypodiploidním karyotypem, tj. dle definice 35–45 chromosomů, diploidním či pseudo-diploidním karyotypem (46 chromosomů), hyperdiploidním karyotypem (47–57 chromosomů), triploidním nebo i tetraploidním karyotypem ( $\geq 58$  chromosomů) a nezařazené karyotypy.



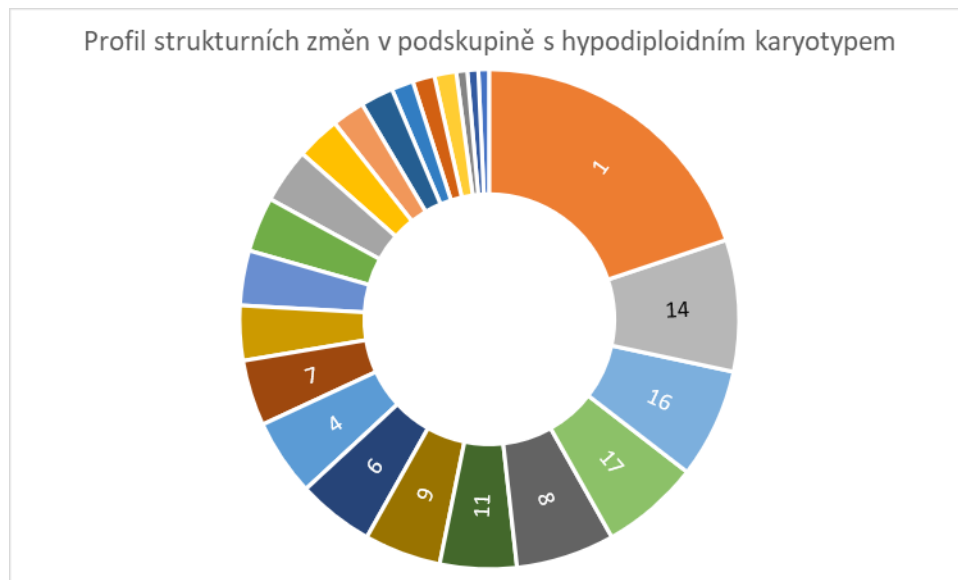
Obr. 10: Graf počtu chromosomů v hlavních patologických klonech s abnormálním karyotypem

Hypodiploidní karyotyp byl pozorován v 53 případech (33 % ze všech pacientů s nalezeným abnormálním karyotypem). Nejčastějšími počty chromosomů v této podskupině byly 45 (31 případů) a 44 (7 případů). Mezi nejčastější početní změny chromosomů patřily kromě ztráty pohlavních chromosomů X a Y především monosomie 13, 14, 8, 10, 22 a 16 (Obr. 11).



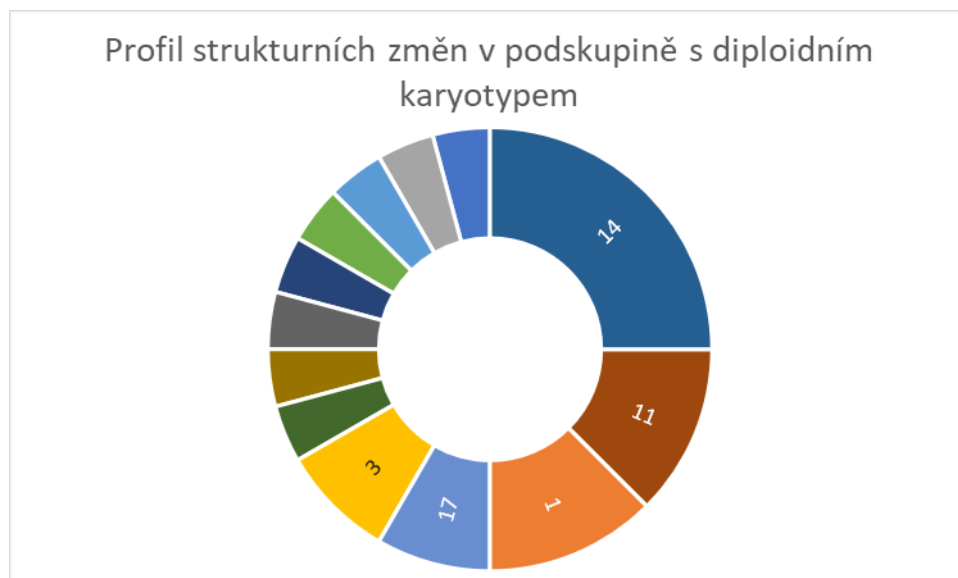
Obr. 11: Nejčastější početní změny chromosomů u pacientů s MM a hypodiploidním karyotypem

Mezi chromosomy nejčastěji se účastníci strukturních změn v této podskupině patřily 1, 14, 16, 17 a 8 (Obr. 12). U 17 % pacientů (9) se zjistilo více patologických klonů.



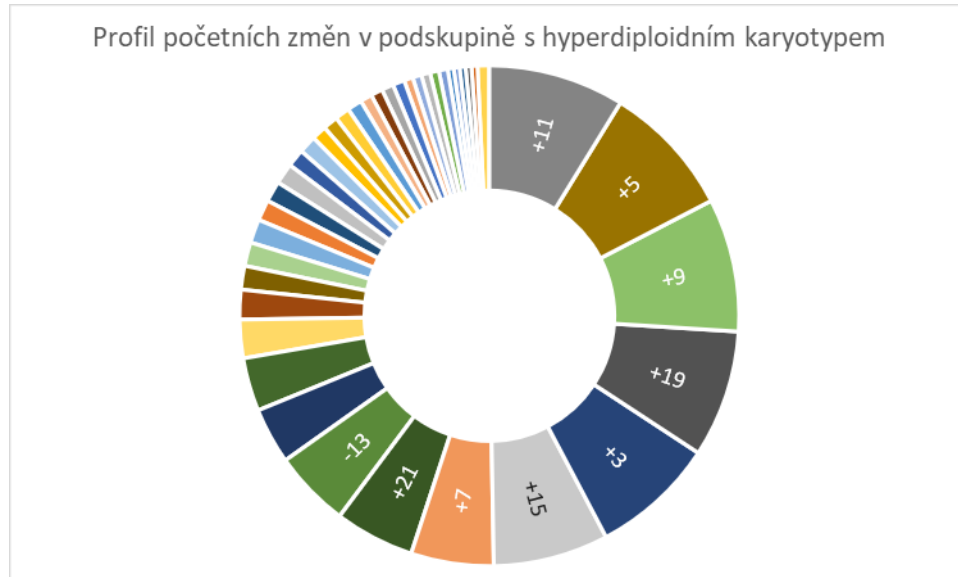
Obr. 12: Chromosomy nejčastěji se účastníci strukturních změn u pacientů s MM a hypodiploidním karyotypem

Diploidní nebo tzv. pseudo-diploidní karyotyp byl nalezen v 13 případech (8 %). Z početních změn se nejvíce vyskytla ztráta chromosomu 13 a 20, strukturních změn se nejvíce účastnily chromosomy 14, 11 a 1 (Obr. 13). U 15 % pacientů (2) se zjistilo více patologických klonů.



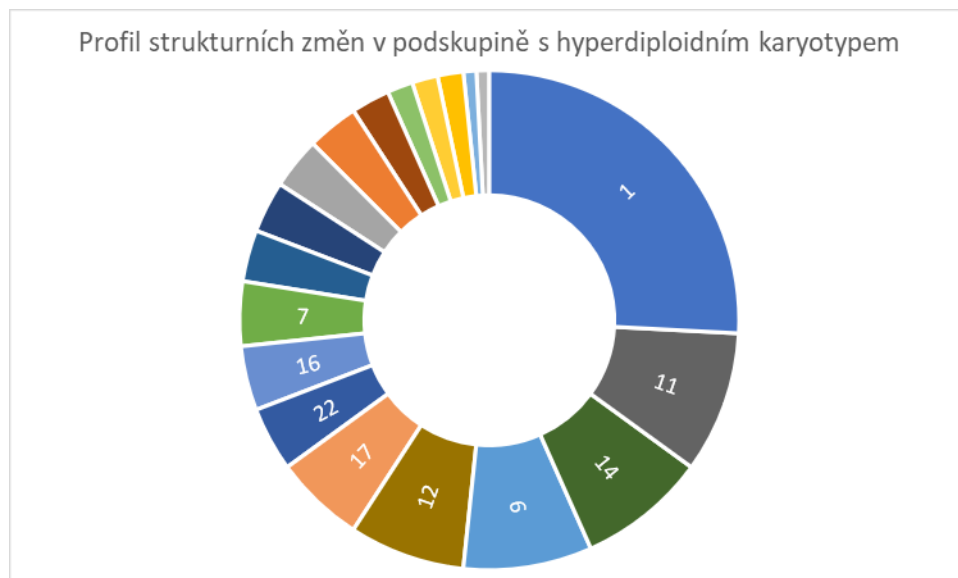
Obr. 13: Chromosomy nejčastěji se účastníci strukturních změn u pacientů s MM a diploidním karyotypem

Hyperdiploidní karyotyp byl detekován u 80 pacientů (50 %). Nejčastěji se vyskytoval počet chromosomů 51 (12 případů), 52 (11 případů), 47 (11 případů) a 50 (10 případů). Mezi nejčastější početní změny patřily trisomie 11, 5, 9, 19, 3, 15, 7 a 21 a monosomie 13 (Obr. 14).



Obr. 14: Nejčastější početní změny chromosomů u pacientů s MM a hyperdiploidním karyotypem

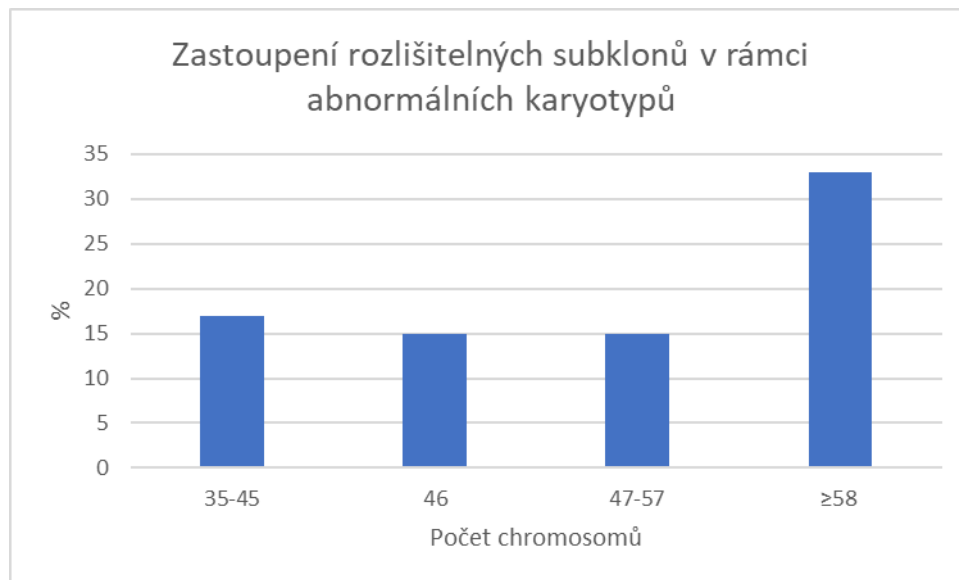
Strukturní změny se nejvíce týkaly chromosomů 1, 11, 14, 6, 12, 17, 22, 16 a 7 (Obr. 15). U 15 % pacientů (12) se zjistilo více patologických klonů.



Obr. 15: Chromosomy, kterých se nejvíce týkaly strukturální změny u pacientů s MM a hyperdiploidním karyotypem

Dvanáct pacientů (8 %) vykazovalo abnormální karyotyp s triploidním či tetraploidním počtem chromosomů. Strukturní změny u této skupiny zasahovaly především chromosom 1, více rozlišitelných patologických subklonů bylo u 33 % pacientů (4).

Porovnání procenta pacientů s jednoznačně rozlišitelnými více patologickými subklony v jednotlivých podskupinách je vidět na Obr. 16.



Obr. 16: Procentuální zastoupení rozlišitelných subklonů v rámci abnormálních karyotypů

Dva pacienti s kompozitním karyotypem a rozsahem počtu chromosomů od 40 do 50 nebyly zařazeni do žádné z předchozích podskupin.

## ZÁVĚR

Hodnotila jsem výsledky cytogenetických vyšetření u souboru 673 poprvé zachycených pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu. Medián věku těchto pacientů byl 65 let a v jednotlivých letech se medián postupně zvyšoval. V české literatuře je medián 65 let uváděn např. v pracích Štokr a kol. (2017) nebo Nováková a Radocha (2021), Szeligová a kol. (2017) uvádí medián 70 let. U tohoto typu nádoru jsme tedy nepozorovali snižování průměrného věku pacientů, které je uváděno u jiných typů nádorů jako např. nádory prsu, žaludku či slinivky břišní (Hamilton a kol. 2022).

U pacientů s prvozáchytem MM byl s využitím klasického karyotypování G-pruhováním nalezen abnormální karyotyp ve 26 %. Patologické plasmocyty se v laboratorních podmínkách dělí málo, a proto je výtěžnost při použití pouze této metody poměrně nízká. V literatuře je obvykle uváděno 30–40 % nalezených abnormálních karyotypů, což je o něco více než v našem případě (Sawyer 2011). Přesto je její používání v rámci diferenciální diagnostiky MM stále doporučováno, a to zejména pro její komplexní přehled o rozsahu patologických změn u jednotlivých pacientů (Barila a kol. 2020).

Základní rozdělení abnormálních karyotypů u MM na hyperdiploidní a nehyperdiploidní bylo zřetelně patrné i v mnou hodnoceném souboru. Hyperdiploidních karyotypů bylo detekováno 50 %, což zcela odpovídá publikovaným datům (Sawyer 2011; Saxe a kol. 2018).

Také na úrovni jednotlivých chromosomových změn je hodnocený soubor pacientů srovnatelný s podobnými, i když většinou méně početnými, soubory publikovanými v literatuře. Mezi nejčastější početní změny u hyperdiploidních karyotypů patřily trisomie chromosomů s lichými čísly (11, 5, 9, 19, 3, 15, 7 a 21) a monosomie 13. Mezi nejčastější početní změny u hypodiploidních karyotypů patřily kromě ztráty pohlavních chromosomů X a Y především monosomie 13, 14, 8, 10, 22 a 16. Až na monosomii 10 u hypodiploidních karyotypů se jedná o dobře definované změny (Sawyer 2011; Saxe a kol. 2018; Smadja a kol. 2001). Odhalení monosomie 10 by mohlo souviset s rozsáhlostí hodnoceného souboru a stojí za bližší prozkoumání.

Závěrem bych si dovolila konstatovat, že cíle vytyčené pro tuto bakalářskou práci byly realizovány. Na základní charakterizaci rozsáhlého souboru pacientů s MM, kterou

jsem v rámci své bakalářské práce prováděla, mohou výzkumníci v Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň dále navázat podrobnějšími analýzami.

**RESUMÉ**

Tato bakalářská práce je zaměřena na přínos stanovení karyotypu cytogenetickými metodami u pacientů s mnohočetným myelomem. Mnohočetný myelom je hematologické maligní onemocnění vycházející z abnormálních plasmocytů. Z pohledu cytogenetiky se však více blíží heterogenním vyšetřením u solidních nádorů. V práci bylo vyhodnoceno vyšetření karyotypu u 673 pacientů postižených tímto onemocněním. Data byla poskytnuta Ústavem lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň z období mezi lety 2000 až 2020. Cílem analýzy bylo vyhodnocení chromosomových abnormalit objevujících se u mnohočetného myelomu a některé další faktory spojené s tímto onemocněním, jako například průměrný věk při diagnóze. Práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou, tyto celky se dále dělí do pěti kapitol.

V teoretické části jsou přiblíženy obory cytogenetika a nádorová cytogenetika, cytogenetická nomenklatura používaná pro zápis abnormálních karyotypů a charakteristika samotného onemocnění. Praktická část je zaměřena na analýzu dat a odpovídá na stanovené výzkumné otázky. Z práce je možné vyvodit, které chromosomy jsou při mnohočetném myelomu nejčastěji postihovány početními a strukturními změnami, medián věku pacientů při diagnóze a procentuální úspěšnost cytogenetických vyšetření.

**RESUME**

This bachelor's thesis is focused on the contribution of karyotype determination by cytogenetic methods in patients with multiple myeloma. Multiple myeloma is hematologic malignant illness caused by abnormal plasmacytes. Although from the cytogenetics perspective it is more like heterogenous examinations of solid tumours. During the research a file of 673 karyotypes of patients with this illness were analysed. The data was provided by Ústav lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň and collected between the years 2000 and 2020. The main goal of this analysis was to evaluate chromosomal abnormalities most common in patients with multiple myeloma and some other factors related to this malady, such as average age of patients at the time of the diagnosis. The work is divided into theoretical part and results which are composed of five chapters.

The theoretical part talks about cytogenetics and oncocytenetics as scientific fields, cytogenetic nomenclature used for recording abnormalities in karyotypes and the characteristics of multiple myeloma. The results are focused on analysing the data collected



and answering research questions. It is possible to conclude which chromosomes are most often affected by structural and numerical changes during this illness, the average age at the time of the diagnosis and the percentage with which the examinations are efficient.

**SEZNAM LITERATURY**

- ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLÍČEK, J. a kol. 2008. *Hematologie – přehled maligních hematologických nemocí*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s. ISBN 978-80-247-2502-4.
- ADAM, Z. a kol. 2007. Mnohočetný myelom – zlepšování diagnostiky a léčby v průběhu posledních 20 let. *Postgraduální medicína: Hemato-onkologie*. Mladá fronta, 9(3), 323–335. ISSN 1212-4184.
- BARILA, G. a kol. 2020. Identification of the true hyperdiploid multiple myeloma subset by combining conventional karyotyping and FISH analysis. *Blood Cancer Journal*. Springer Nature, 10(18). ISSN 2044-5385. DOI: 10.1038/s4140-8020-0285-6
- DIMOPOULOS, M. A., TERPOS, E. a NIESVIZKY, R. 2014. Jak mění lenalidomid léčbu pacientů s mnohočetným myelomem. In: *Mnohočetný myelom, Consensus In Hematology*. Praha: AT Mediprint, s. 4–11. ISBN 978-80-905639-3-3.
- HAMILTON, A. C. a kol. 2022. Early-Onset Cancers in Adults: A Review of Epidemiology, Supportive Care Needs and Future Research Priorities. *Cancers*. MDPI, 14(16), 4021. ISSN 2072-6694. DOI: 10.3390/cancers14164021
- KOČÁREK, E., PÁNEK, M. a NOVOTNÁ D. 2010. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1880-7.
- KOLÁŘ, Z. a kol. 2003. *Molekulární patologie nádorů*. 1. vyd. Olomouc: EPAVA. ISBN 80-86297-15-2.
- KUGLÍK, P. 2000. *Vybrané kapitoly z cytogenetiky*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-2334-1.
- LEXOVÁ, S. a kol. 2000. *Hematologie pro zdravotní laboranty (1. díl)*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-304-X.
- MAISNAR, V., POPKOVÁ, T. a ŠTORK, M. 2022. *Mnohočetný myelom – Jak s ním žít?* Dvůr Králové nad Labem: Nakladatelství, studio a tiskový servis ATD Miroslav Všečetka pro Klub pacientů mnohočetný myelom, z.s. ISBN 978-80-86358-21-5.
- MICHALOVÁ, K. 1999. *Úvod do lidské cytogenetiky*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-281-7.
- NOVÁKOVÁ, D. a RADOCHA, J. 2021. Léčba relabujícího a refrakterního mnohočetného myelomu. *Onkologie*. Solen, 15(2), 77-85. ISSN 1803-5345. DOI: 10.36290/xon.2021.015

- OTOVÁ, B. a kol. 2019. *Lékařská biologie a genetika (I. díl)*. 2. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2835-6.
- SAWYER, J. R. 2011. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genetics*. Elsevier, 204(1), 3–12. ISSN 2210-7762. DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2010.11.002
- SAXE, D. a kol. 2019. Recent advances in cytogenetic characterization of multiple myeloma. *Int J Lab Hem*. John Wiley & Sons Ltd., 41(1), 5–14. ISSN 1751-553X. DOI: 10.1111/ijlh.12882
- SHAFFER, L. G. a TOMMERUP, N. (eds) 2005. *ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, CT: Karger. ISBN 3-8055-8019-3.
- SMAJDA, N. V. a kol. 2001. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. American Society of Hematology, 98(7), 2229–2238. ISSN 1528-0020. DOI: 10.1182/blood.V98.7.2229
- SZELIGOVÁ, L. a kol. 2017. Mnohočetný myelom a diferenciální diagnostika bolestí páteře. *Onkologie*. Solen, 11(6), 300–305. ISSN 1803-5345. DOI: 10.36290/xon.2017.055
- ŠPIČKA, I. a STRAUB, J. 2013. Mnohočetný myelom. *Postgraduální medicína: Hemato-onkologie*. Mladá fronta, 15(5), 526–530. ISSN 1212-4184.
- ŠPIČKA, I. et al. 2005. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-330-3.
- ŠTORK, M. a kol. 2017. Novinky v léčbě mnohočetného myelomu. *Interní Med*. Solen, 19(1), 20–22. ISSN 1803-5256. DOI: 10.36290/int.2017.003
- ZAORALOVÁ, R. a kol. 2007. Clinical implications of chromosomal aberrations (13q14 and 17p13 deletion, translocation t(4;14) and 1q21 amplification) in patients with relapsed multiple myeloma treated with thalidomide or bortezomib (Velcade). In: *Cytogenetic and Immunogenetic Workshop: From cell sorting to plasma cell identification and detection chromosomal aberrations in multiple myeloma: Immunomagnetic cell separation for clinical use: 10.–11. říjen, 2007*. Brno: Masarykova Univerzita. ISBN 978-80-210-4417-3.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schéma dvouchromatidového chromosomu (Kočárek, Pánek a Novotná 2010).....	7
Obr. 2: Normální karyotyp ženy (fotografie pořízena na ÚLG LF UK a FN Plzeň) .....	8
Obr. 3: Hyperdiploidní karyotyp pacienta s MM s početními i strukturními změnami chromosomů (fotografie pořízena na ÚLG LF UK a FN Plzeň) .....	9
Obr. 4: G-pruhování lidského karyotypu (Shaffer a Tommerup 2005).....	14
Obr. 5: Idiogram G-pruhování normálního lidského chromosomu v různých stupních rozlišení (300, 400, 550, 700 a 850 pruhů) (Shaffer a Tommerup 2005).....	15
Obr. 6: Karyotyp pacienta s chronickou myeloidní leukémií a typickým filadelfským chromosomem – derivovaným chromosomem 22 (fotografie pořízena na ÚLG LF UK a FN Plzeň).....	23
Obr. 7: Graf znázorňující věk pacientů s prvozáchytem MM v souboru 673 pacientů.....	37
Obr. 8: Graf s přehledem úspěšnosti vyšetření karyotypu u pacientů s MM .....	38
Obr. 9: Graf počtu normálních versus abnormálních karyotypů u prvozáchytní MM .....	38
Obr. 10: Graf počtu chromosomů v hlavních patologických klonech s abnormálním karyotypem .....	39
Obr. 11: Nejčastější početní změny chromosomů u pacientů s MM a hypodiploidním karyotypem .....	39
Obr. 12: Chromosomy nejčastěji se účastnící strukturních změn u pacientů s MM a hypodiploidním karyotypem.....	40
Obr. 13: Chromosomy nejčastěji se účastnící strukturních změn u pacientů s MM a diploidním karyotypem.....	40
Obr. 14: Nejčastější početní změny chromosomů u pacientů s MM a hyperdiploidním karyotypem .....	41
Obr. 15: Chromosomy, kterých se nejvíce týkaly strukturní změny u pacientů s MM a hyperdiploidním karyotypem .....	41
Obr. 16: Procentuální zastoupení rozlišitelných subklonů v rámci abnormálních karyotypů .....	42

## **SEZNAM PŘÍLOH**

**Příloha 1:** Povolení sběru informací ve FN Plzeň

## PŘÍLOHY

### Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň



#### FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory  
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín  
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Lucie Holá

Studentka oboru Biologie se zaměřením na vzdělávání / Chemie se zaměřením na vzdělávání

Fakulta pedagogická – Centrum biologie, geověd a envigogiky

Západočeská univerzita v Plzni

### Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s lékařskou fakultou FN Plzeň **uděluji souhlas** se získáváním / zpracováním anonymizovaných informací o laboratorních metodách, používaných na pracovišti *Ústavu lékařské genetiky (ÚLG) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Přínos stanovení karyotypu cytogenetickými metodami u pacientů s mnohočetným myelomem*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka ÚLG souhlasí s Vaším postupem.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.**, o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Přístup do laboratorních / zdravotnických provozů FNP Vám není povolen.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být zcela anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **pan doc. RNDr. Pavel Dvořák, Ph.D., odborný pracovník v laboratorních metodách a přípravě léčivých přípravků ÚLG FN Plzeň**.

Po zpracování Vámi zjištěných údajů **poskytnete** zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

**Mgr. Bc. Světluše Chabrová**

Manažerka pro vzdělávání nelékařů

Útvar náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Fakultní nemocnice Plzeň

alej Svobody 80, 304 60 Plzeň – Lochotín

Tel: 377 103 204 / 377 402 207

E-mail: [chabrovas@fnplzen.cz](mailto:chabrovas@fnplzen.cz)

2. 8. 2022