

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Moderní přístup ke klasifikaci, diagnostice a léčbě hematologických malignit

Barbora Vraná

Bakalářská práce

2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbora Vraná**  
Osobní číslo: **C13407**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Moderní přístupy ke klasifikaci, diagnostice a terapii hematologických malignit**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracujte literární rešerši obsahující:

1. Popis mechanismů vedoucích k rozvoji hematologických malignit, incidence a prevalence jednotlivých typů hematologických malignit. Vývoj incidence a mortality hematologických malignit za uplynulé období, odhad budoucího vývoje.
2. Souhrnný popis dosavadních a nových moderních principů používaných ke klasifikaci jednotlivých typů hematologických malignit. Revised European American Lymphoma (REAL) klasifikace, klasifikace hematologických malignit podle WHO a další moderní systémy klasifikace.
3. Přehled současných trendů diagnostiky hematologických malignit a význam implementace moderních technik do současné laboratorně diagnostické praxe. Imunofenotypizace, cytogenetická analýza, sledování molekulárních biomarkerů, metody molekulární genetiky a proteomiky.
4. Popis nových postupů vedoucích k terapii hematologických malignit, použití monoklonálních protilátek, alogenní transplantace krvetvorných buněk, terapie pomocí inhibice kináz, význam a potenciál inhibitorů specifických proteinů signálních drah buňky.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Concise Manual of Hematology and Oncology, Berger, D.P., Engelhardt, M., Hen, H., Mertelsmann, R., Andreeff, M., Koziner, B., Messner, H.A., Thatcher, N., Springer, 2008; Hematological Malignancies (Methods in Molecular Biology), Czader, M., Springer, 2013; původní experimentální práce, přehledové články, databáze Web of Science, Scopus, NCBI, Google Scholar a další relevantní elektronické zdroje.**

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Radim Havelek, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

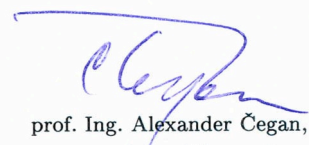
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlášení autora:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice  
Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 7.7.2017

Vraná Barbora

## **PODĚKOVÁNÍ:**

Chtěla bych poděkovat RNDr. Radimu Havelkovi Ph.D. za cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při psaní bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá klasifikací a diagnostikou hematologických malignit s využitím nejmodernějších technik.

Práce je rozdělena do pěti hlavních kapitol. Nejprve stručně popisuje vznik hematologických malignit.

Následuje kapitola zabývající se nejmodernějším klasifikačním systémem hematologických malignit - WHO klasifikace, která je neustále doplňována o nové informace. WHO klasifikace k tomuto využívá nejnovější laboratorní metody, a to především z oblasti molekulární genetiky.

Třetí kapitola je věnována incidenci a prevalenci hematologických malignit. Obsahuje informace o nejčastějších typech hematologických malignit, počtu nově diagnostikovaných případů a úmrtnosti na jednotlivých kontinentech v důsledku těchto nádorových onemocnění.

Dále se práce zabývá moderními diagnostickými metodami, využívanými v klinické praxi. Zároveň je zde uveden i relativně nový obor: proteomika a s ní spojené instrumentální techniky, které prozatím mají uplatnění v rámci experimentální praxe. V kapitole o diagnostice jsou zahrnuty i molekulární biomarkery a jejich využití pro diagnostiku těchto onemocnění.

Poslední kapitola pojednává o současných trendech terapie hematologických malignit s využitím inhibitorů buněčné signalizace, specifických protilátek a transplantace krvetvorných kmenových buněk.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

WHO klasifikace, hematologické malignity, fluorescenční hybridizace *in situ*, polymerázová řetězová reakce, transplantace, genetické abnormality, inhibitory, imunokonjugáty

## **TITLE**

MODERN APPROACHES TO CLASSIFICATION, DIAGNOSIS AND THERAPY OF  
HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

## **ANNOTATION**

Bachelor thesis is focused on modern approaches to classification, diagnosis and therapy of haematological malignancies.

There are five major chapters: pathogenesis, classification, incidence and prevalence, diagnostic techniques and therapy of haematological malignancies.

The first part briefly describes the biological mechanism of haematological malignancies.

The WHO classification, the modern classification system of haematological malignancies, is described in the second part.

The information about the most common types of haematological malignancies, their incidence, prevalence, numbers of diagnosed patients and mortality is in the chapter three.

The fourth chapter deal with diagnostic techniques used in clinical practise, such as flow cytometry, polymerase chain reaction or DNA sequencing. The proteomics, the new field of research in malignancies is also described here.

The final part concerns on treatment. New inhibitors, monoclonal antibodies and allogeneic haematopoietic stem cell translation are described.

## **KEYWORDS**

WHO classification, hematologic malignancies, fluorescence *in situ* hybridization, transplantation, genetic abnormality, kinase, inhibitor, immunoconjugate

## OBSAH

<b>0</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>1</b>	<b>Patofyziologie hematologických malignit</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Klasifikace Hematologických malignit</b> .....	<b>15</b>
2.1	FAB (French-American-British) klasifikace .....	15
2.2	Revised European-American (R.E.A.L) klasifikace – klasifikace lymfomů .....	17
2.3	WHO (World health organization) klasifikace – klasifikace lymfomů a leukémií .....	19
2.3.1	WHO klasifikace lymfomů .....	21
2.3.2	WHO klasifikace myeloidních onemocnění .....	24
<b>3</b>	<b>Incidence a prevalence nejčastějších hematologických malignit</b> .....	<b>27</b>
3.1	Hodgkinovy lymfomy (HL) .....	27
3.2	Non-Hodgkinovy lymfomy (NHL) .....	30
3.3	Leukémie .....	32
3.3.2	Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) .....	33
3.3.2	Akutní myeloidní leukémie (AML) .....	35
3.3.3	Chronická lymfatická leukémie (CLL) .....	36
3.3.4	Chronická myeloidní leukémie (CML) .....	37
3.4	Mnohočetný myelom (MM) .....	37
3.5	Závěr .....	39
<b>4</b>	<b>Diagnostika</b> .....	<b>40</b>
4.1	Metody využívané v klinické praxi .....	40
4.1.2	Imunofenotypizace .....	40
4.1.3	Cytogenetická analýza .....	43
4.1.4	Metody molekulární genetiky .....	47
4.2	Metody využívané pro výzkumné účely .....	51
4.2.1	Metody proteomiky .....	51
<b>5</b>	<b>Terapie</b> .....	<b>54</b>
5.1	Imunoterapie .....	54
5.1.2	Nekonjugované monoklonální protilátky .....	55
5.1.3	Radioimunokonjugáty .....	56
5.1.4	Imunotoxiny .....	56
5.1.5	Imunokonjugáty s protinádorovými léčivy (ADCs) .....	57
5.2	Alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT – hematopoietic stem cell transplantation) .....	58



5.2.1	Autologní transplantace hematopoetických kmenových buněk.....	58
5.2.2	Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk.....	59
5.2.3	Reakce štěpu proti leukémii (GVL – graft versus leukaemia), reakce štěpu proti hostiteli (GVHD - graft versus host disease) .....	59
<b>5.3</b>	<b>Inhibitory signálních drah buňky.....</b>	<b>60</b>
5.3.2	Inhibice signální dráhy MAPK (mitogen-activated protein kinase) .....	60
5.3.3	Inhibice signální dráhy PI3K/AKT (phosphatidyl-3-inositol-kinase/protein kinase B) 62	
5.3.4	Inhibice signální dráhy JAK (Janusova kináza)/STAT (signal transducer and activator of transcription).....	64
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatura: .....</b>	<b>68</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

OBRÁZEK 1: MYELOBLAST A LYMFOBLAST .....	15
OBRÁZEK 2: MORFOLOGIE BUNĚK U JEDNOTLIVÝCH TYPŮ ALL V KOSTNÍ DŘENI.....	16
OBRÁZEK 3: BLASTY GRANULOCYTŮ A AGRANULOCYTŮ .....	24
OBRÁZEK 4: SCHÉMA KONSTRUKCE PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE.....	42
OBRÁZEK 5: VÝSLEDEK G-PRUHOVÁNÍ CHROMOZOMŮ U PACIENTA S MNOHOČETNÝM MYELOMEM.....	44
OBRÁZEK 6: VÝSLEDEK METODY FISH.....	45
OBRÁZEK 7: VÝSLEDEK GCH METODY .....	46
OBRÁZEK 8: SCHÉMA PCR.....	48
OBRÁZEK 9: SCHÉMA ANALÝZY PROTEINŮ METODOU 2D-DIGE .....	52
OBRÁZEK 10: IMUNOKONJUGÁTY.....	54
OBRÁZEK 11: SIGNÁLNÍ KASKÁDA MAPK.....	61
OBRÁZEK 12: SIGNÁLNÍ KASKÁDA PI3K/AKT .....	63
OBRÁZEK 13: SIGNALIZACE U ZDRAVÉ BUŇKY A MYELOIDNÍ BUŇKY .....	65
TABULKA 1: CHROMOZOMÁLNÍ TRANSLOKACE U LEUKÉMIÍ .....	14
TABULKA 2: R.E.A.L KLASIFIKACE LEUKÉMIÍ .....	18
TABULKA 3: WHO KLASIFIKACE LYMFOMŮ .....	21
TABULKA 4: WHO KLASIFIKACE MYELOIDNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	25
TABULKA 5: VĚKOVĚ STANDARDIZOVANÁ INCIDENCE HL NA 100 000 OSOB NA JEDNOTLIVÝCH SVĚTADÍLECH V ROCE 2012 .....	28
TABULKA 6: POČET NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝCH PŘÍPADŮ HL A ÚMRTNOST V 2012 V ČESKÉ REPUBLICI A EVROPĚ .....	28
TABULKA 7: POČET NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝCH PŘÍPADŮ HL A ÚMRTNOST V USA ZA POSLEDNÍCH DESET LET.....	29
TABULKA 8: PREVALENCE HL Z ROKU 2012 V ČR A EVROPĚ .....	29
TABULKA 9: PREVALENCE HL NA SVĚTĚ S VÝJIMKOU EVROPY ZA PĚTILETÉ OBDOBÍ Z ROKU 2012 .....	29
TABULKA 10: VĚKOVĚ STANDARDIZOVANÁ INCIDENCE NHL NA 100 000 OSOB V RÁMCI JEDNOTLIVÝCH SVĚTADÍLŮ V ROCE 2012.....	30
TABULKA 11: VĚKOVĚ STANDARDIZOVANÁ INCIDENCE NHL NA 100 000 OSOB V RÁMCI JEDNOTLIVÝCH SVĚTADÍLŮ V ROCE 2012.....	30
TABULKA 12: POČET NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝCH PŘÍPADŮ NHL A ÚMRTNOST V USA ZA POSLEDNÍCH DESET LET.....	31
TABULKA 13: PREVALENCE NHL Z ROKU 2012 V ČR A EVROPĚ .....	31
TABULKA 14: PREVALENCE NHL NA SVĚTĚ S VÝJIMKOU EVROPY ZA PĚTILETÉ OBDOBÍ Z ROKU 2012 .....	31
TABULKA 15: VĚKOVĚ STANDARDIZOVANÁ INCIDENCE LEUKÉMIÍ NA 100 000 OSOB NA JEDNOTLIVÝCH SVĚTADÍLECH V ROCE 2012 .....	32
TABULKA 16: POČET NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝCH PŘÍPADŮ LEUKÉMIE A ÚMRTNOST V 2012 V ČESKÉ REPUBLICI A EVROPĚ .....	32

TABULKA 17: POČET NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝCH PŘÍPADŮ LEUKÉMIÍ A ÚMRTNOST V USA ZA POSLEDNÍCH DESET LET.....	33
TABULKA 18: PREVALENCE LEUKÉMIÍ Z ROKU 2012 V ČR A EVROPĚ .....	33
TABULKA 19: PREVALENCE NHL NA SVĚTĚ S VÝJIMKOU EVROPY ZA PĚTILETÉ OBDOBÍ Z ROKU 2012 ..	33
TABULKA 20: DIAGNOSTIKOVANÉ PŘÍPADY ALL A ÚMRTNOST V USA ZA POSLEDNÍCH DESET LET.....	34
TABULKA 21: DIAGNOSTIKOVANÉ PŘÍPADY AML A ÚMRTNOST V USA ZA POSLEDNÍCH DESET LET.....	35
TABULKA 22: DIAGNOSTIKOVANÉ PŘÍPADY CHRONICKÉ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE A ÚMRTNOST V USA ZA POSLEDNÍCH DESET LET.....	36
TABULKA 23: DIAGNOSTIKOVANÉ PŘÍPADY CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A ÚMRTNOST V USA ZA POSLEDNÍCH DESET LET.....	37
TABULKA 24: VĚKOVĚ STANDARDIZOVANÁ INCIDENCE MNOHOČETNÉHO MYELOMU NA 100 000 OSOB NA JEDNOTLIVÝCH SVĚTADÍLECH V ROCE 2012.....	38
TABULKA 25: POČET NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝCH PŘÍPADŮ MNOHOČETNÉHO MYELOMU A ÚMRTNOST V 2012 V ČESKÉ REPUBLICĚ A EVROPĚ .....	38
TABULKA 26: POČET NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÝCH PŘÍPADŮ MNOHOČETNÉHO MYELOMU A ÚMRTNOST V USA ZA POSLEDNÍCH DESET LET .....	38
TABULKA 27: PREVALENCE MNOHOČETNÉHO MYELOMU Z ROKU 2012 V ČR A EVROPĚ .....	39
TABULKA 28: PREVALENCE MNOHOČETNÉHO MYELOMU NA SVĚTĚ S VÝJIMKOU EVROPY ZA PĚTILETÉ OBDOBÍ Z ROKU 2012.....	39

## 0 ÚVOD

Hematologické malignity jsou čtvrtým nejrozšířenějším typem nádorového onemocnění. Počet nově diagnostikovaných pacientů trpících některým typem hematologických malignit rok od roku roste. Z tohoto důvodu je nutné stále zdokonalovat diagnostické metody, klasifikaci i léčbu hematologických malignit.

V posledním desetiletí došlo k značným pokrokům v oblasti klinické hematologie. Především díky dynamickému rozvoji molekulární genetiky je lépe popsána patofyziologie hematologických malignit, která je důležitá k lepšímu pochopení a tudíž i k léčbě onemocnění.

Zlepšení diagnostických metod umožnilo nejen rychlejší zachycení onemocnění, ale i dokonalejší klasifikaci hematologických malignit. Dříve byla klasifikace a diagnostika založena především na morfologii buněk což do jisté míry komplikovalo diagnostiku spolu indikací účinné terapie. V dnešní době se využívají molekulárně genetické, cytochemické, imunohistochemické, cytogenetické a další informace k přesné a objektivní identifikaci typu malignity.

K velkému rozvoji došlo i v oblasti léčby hematologických malignit. Byly objeveny nové monoklonální protilátky a inhibitory tyrozin kináz, které jsou cílené proti maligním buňkám hematopoetického původu.

Cílem bakalářské práce je pospat nejaktuálnější trend v oblasti klasifikace, diagnostiky a terapie hematologických malignit.

# 1 PATOFYZIOLOGIE HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

Hematologické malignity, stejně jako ostatní nádorová onemocnění, vznikají vícestupňovým procesem, při kterém dochází k transformaci normální buňky na buňku maligní. K této transformaci je nutná kooperace dvou typů mutací, kdy jeden typ dodává buňce proliferační výhodu a druhý typ mutace ovlivňuje diferenciaci.

U maligních buněk může docházet k poruše apoptózy nebo k aktivaci telomeráz, a tudíž posílení replikačního signálu. Další možností je porušení kontroly buněčného cyklu za současné inhibice diferenciaci buněk. Buňky, které nejsou schopné další diferenciaci, se začínou hromadit v kostní dřeni a následně dochází k vyplavování nevyzrálých buněk do periferní krve (Pavlova a kolektiv, 2002; Gazdová a kolektiv, 2009).

Počet změněných funkcí v buňce závisí na stabilitě genomu. Destabilizace genomu je často způsobena poruchami proteinem p53.

Pro vznik hematologické malignity jsou dále typické chromozomální přestavby, a to hlavně translokace. Příklady translokací u jednotlivých typů malignit jsou uvedené v tabulce 1. Následkem translokace může být fúze genu pro transkripční faktor nebo receptorovou kinázu s jinými, nepříbuznými geny. Fúze vede ke vzniku chimérického proteinu, který ovlivňuje regulační systémy buňky (Pavlova a kolektiv, 2002; Gazdová a kolektiv, 2009).

K mnoha mutacím dochází již při vzniku primární malignity, ale některé mohou být výsledkem progresu onemocnění či vzniku rezistence na léčbu. Většina mutací vede ke konstitutivní aktivaci specifických onkogenů. V poslední době bylo zjištěno, že i při použití cílené léčby dochází k mutacím vedoucím ke vzniku rezistence nádorové buňky na léčbu. Mutace způsobí strukturální změnu proteinu, a tím se zamezí vazbě léku a inaktivaci cíleného působení. Jiné, nedávno popsané mutace, zahrnují alternativní sestřih transkriptu, který může změnit čtecí rámec použitý pro translaci, a tak dojde k expresi proteinu funkčně odlišného od originálního (O'Brien a kolektiv, 2010).

Jeden z typů hematologických malignit je např. leukémie. Leukémie je onemocnění, při kterém dochází ke vzniku maligních lymfocytů a k hromadění nezralých lymfocytů v kostní dřeni. Procesy vedoucí k rozvoji leukémie jsou označovány jako leukemogeneze. Jeden z možných mechanismů leukemogeneze je delece v tumor supresorovém genu. Některé z delecí zahrnují ztrátu microRNA, které fungují jako supresory, výsledkem je nekontrolovatelná proliferace bez diferenciaci buněk (O'Brien a kolektiv, 2010).

U leukémií běžně dochází ke snížení regulace exprese tumorových supresorů nebo naopak ke zvýšení exprese onkogenů. Ke snížení regulace nejčastěji dochází z důvodu delece genu nebo jeho hypermethylace (O'Brien a kolektiv, 2010).

Tabulka 1: Chromozomální translokace u leukémií

<b>Cytogenetická data</b>	<b>Lokace genů</b>	<b>Název genů</b>	<b>Typ leukémie</b>
<b>t(1;3)(p32;p21)</b>	1p32; 3p21a	TAL1-TCTAb	T-ALL
<b>t(1;7)(p32;q34)</b>	1p32; 7q35c	TAL1-TRB	T-ALL
<b>t(1;7)(p34;q34)</b>	1p35-p34.3; 7q35	LCK-TRB	T-ALL
<b>t(4;11)(q21;p15)</b>	4q21-q25; 11p15.5	RAP1GDS1-NUP98	T-ALL
<b>t(5;14)(q35;q32.2)</b>	5q35.1; 14q32.2	TLX3-BCL11B	T-ALL
<b>t(6;11)(q27;q23)</b>	6q27; 11q23	MLLT4-MLL	T-ALL
<b>t(7;9)(q34;q34)</b>	7q35; 9q34.3	TRB-NOTCH1	T-ALL
<b>t(7;14)(q35;q32.1)</b>	7q34; 14q32.1	TBR-TCL1A	T-ALL
<b>t(1;5)(q22;q33)</b>	1q12; 5q31-q32	PDE4DIP-PDGFRB	B-ALL
<b>t(1;9)(q24;q34)</b>	1q22-q24; 9q34.1	RCSD1-ABL1	B-ALL
<b>t(1;14)(q21;q32)</b>	1q21; 14q32.33	BCL9-IGH	B-ALL
<b>t(1;19)(q23;p13)</b>	1q23; 19p13	PBX1-TCF3	B-ALL
<b>t(2;8)(p12;q24)</b>	2p12; 8q24.21	MYC-IGK	B-ALL
<b>t(1;11)(q21;q23)</b>	1q21; 11q23	AF1Q-MLL	AML
<b>t(1;12)(q25;p13)</b>	1q24-q25; 12p13	ABL2-ETV6	AML
<b>t(1;14)(q25;q32)</b>	1q25.2; 14q32.33	LHX4-IGH	AML
<b>t(1;19)(q23;p13)</b>	1q23; 19p13	PBX1-TCF3	AML
<b>t(1;21)(p35;q22)</b>	1p35; 21q22.3	YTHDF2-CBFA2	AML
<b>t(1;21)(p36;q22)</b>	1p36.23-p33; 21q22.3	PRDM16-CBFA2	AML
<b>t(1;21)(q21;q22)</b>	1q21; 21q22.3	ZNF687-CBFA2	AML
<b>t(1;22)(p13;q13)</b>	1p13; 22q13	RBM15-MKL1	AML
<b>t(5;12)(q33;p13)</b>	5q31-q32; 12p13	PDGFRB-ETV6	MDS
<b>t(6;9)(p23;q34)</b>	6p23; 9q34	DEK-NUP214	MDS
<b>t(6;12)(p21;p13)</b>	6p21; 12p13	CCND3-ETV6	MDS
<b>t(8;12)(q22;q13)</b>	8q22; 12q15	??-HMGA2	MDS
<b>t(8;13)(p12;q12)</b>	9q22; 12p13	SYK-ETV6	MDS

## 2 KLASIFIKACE HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

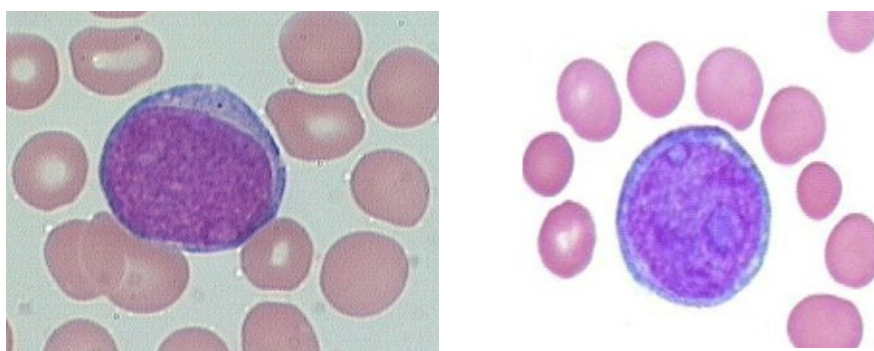
### 2.1 FAB (French-American-British) klasifikace

FAB klasifikace je jedna z prvních klasifikací, která byla využívána k odlišení jednotlivých typů leukémií, konkrétně rozděluje akutní leukémie. Byla navržena v roce 1976 a je vytvořena na základě morfologických a cytochemických dat. Tato klasifikace slouží ke klasifikaci pouze leukémií (Segeren a kolektiv, 1996).

Dle této klasifikace byla ALL (akutní lymfoblastová leukémie) rozdělena morfologicky na podtypy L1-L3 a AML (akutní myeloidní leukémie) rozdělena do osmi morfologických subtypů (Segeren a kolektiv, 1996).

Ke klasifikaci se využívá charakteristika blastů. Blasty jsou velké, nevyzrálé hematopoetické progenitorové buňky s chromatinem a jádrem, ve kterém je přítomno několik jadérek. Blast se diferencuje do lymfoblastu nebo myeloblastu. Rozlišit myeloblast od lymfoblastu může být obtížné (obrázek 1). Myeloblast má vysoký nukleo/cytoplazmatický poměr, cytoplazma se zhušťuje k okraji, obsahuje jádro s jemným chromatinem a několika jadérky. V cytoplazmě myeloblastu jsou přítomna azurofilní granula. Lymfoblast je o něco menší než myeloblast a má pouze úzký lem cytoplazmy. Stejně jako myeloblast i lymfoblast obsahuje jádro s jadérky, ale chromatin je hutnější (Schmaier a kolektiv, 2003).

Na pravé straně se nachází myeloblast, který má velké jádro s jemným chromatinem a patrnými jadérky, cytoplazma se k okraji buňky zhušťuje.



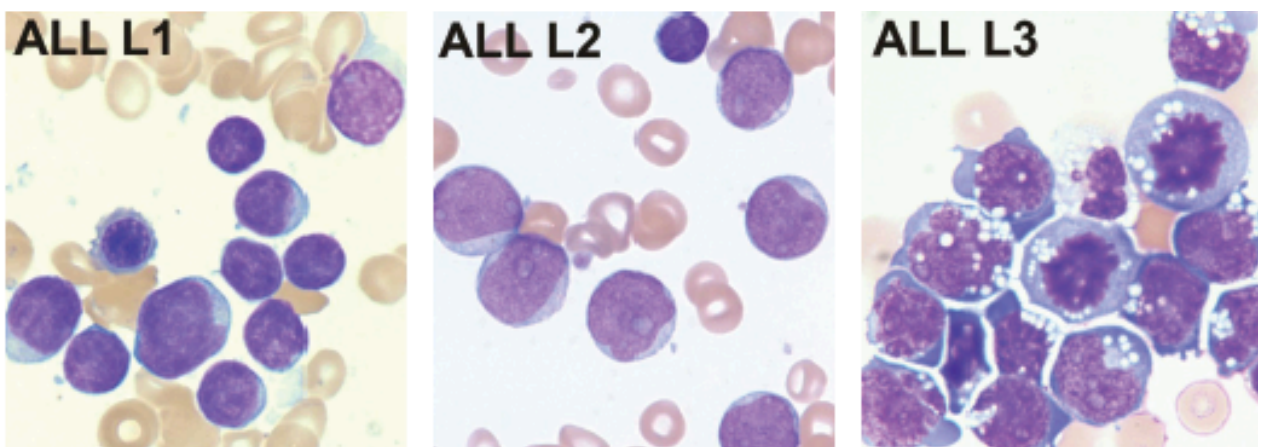
Obrázek 1: Myeloblast a lymfoblast\*

Na pravé straně se nachází myeloblast, který má velké jádro s jemným chromatinem a patrnými jadérky, cytoplazma se k okraji buňky zhušťuje. Na levé straně se nachází lymfoblast s velkým kulatým jádrem, zabírající téměř celou buňku a jsou v něm patrná jadérka.

---

\* Zdroje obrázku jsou uvedené na straně 84

Buňky ALL typu L1 jsou relativně malé, mohou být stejně malé jako vyztřalé lymfocyty. Tyto buňky obsahují jádro s jemným chromatinem a nepatrnými jadérky a mají pouze úzký lem cytoplazmy. Buněčná populace u ALL typu L2 může být v některých případech heterogenní, ale většinou jsou přítomné malé blasty společně s velkými lymfoblasty s nápadnými jadérky. Cytoplazma je světlejší a může obsahovat granula. Blasty u ALL typu L3 jsou obvykle snadno odlišitelné od méně vyztřalé akutní pre-B lymfoblastové leukémie a akutní T-lymfoblastové leukémie. Vyznačují se intenzivně bazofilní cytoplazmou, obsahující vakuoly a jsou dobře patrná jadérka v jádře, jak je vidět na obrázku 2 (Erber a kolektiv, 2010).



*Obrázek 2: Morfologie buněk u jednotlivých typů ALL v kostní dřeni*

*Na pravé straně jsou lymfoblasty, vyskytující se u ALL typu L1. Lymfoblasty jsou malé s velkým jádrem, které zabírá celou nebo téměř celou buňku.*

*Na prostředním obrázku jsou buňky vyskytující se u ALL typu L2. Je zde malý blast v horní části obrázku a velké lymfoblasty s úzkým lemem cytoplazmy a dobře patrnými jadérky.*

*Na levé straně obrázku jsou buňky vyskytující se u ALL typu L3. Lymfoblasty mají jádro, které nezabírá tak velkou část buňky jako jádro u lymfoblastů u předchozích typů leukémie. Typickým znakem lymfoblastů u ALL typu L3 je bazofilní cytoplazma a jasně patrné vakuoly.*

AML je na základě FAB klasifikace dělena do osmi subtypů M0-M7. Stejně jako ALL i AML je založena na morfologii blastů. U AML se při FAB klasifikaci využívá i cytochemické barvení, při kterém je použita myelopoxidáza (MPO) a Sudanova čerň B (SSB) k prokázání myeloblastů a nespecifické esterázy, která je pozitivní v případě monocytárního původu blastů (Erber a kolektiv, 2010; Kačírková a kolektiv, 2007).



## **2.2 Revised European-American (R.E.A.L) klasifikace – klasifikace lymfomů**

V roce 1994 byla publikována nová klasifikace R.E.A.L, rozdělující lymfomy. Tato klasifikace byla vytvořena International Lymphoma Study Group (I.L.S.G.), a je výsledkem sjednocení a doplnění několika předešlých klasifikací, a to zejména Kiel klasifikací, Working Formulation a Lukes-Collins klasifikace (Harris a kolektiv, 2000).

Klasifikace využívá morfologických, genetických, imunofenotypových a klinických vlastností, kdy některé nemoci jsou diagnostikovány primárně díky morfologii. Příkladem je folikulární lymfom, angioimunoblastický T-lymfom či nodulárně sklerotický Hodgkinův lymfom. U těchto onemocnění slouží imunofenotypizace spíše k potvrzení diagnózy, ovšem jiná onemocnění, jako například lymfom z malých lymfocytů nebo aplastický velkobuněčný lymfom, jsou primárně diagnostikovány na základě imunofenotypizace. U některých lymfomů jsou důležitým kritériem pro diagnózu genetické abnormality; k těmto onemocněním patří lymfom z pláštěvých buněk t(11;14), folikulární lymfom t(14;18) nebo Burkittův lymfom t(8;14) (Harris a kolektiv, 2000).

Na základě kritiky došlo ke klinickému testování R.E.A.L klasifikace, která byla provedena 5 experty ze společnosti I.L.S.G., a to u 1 300 pacientů trpících non-Hodgkinovým lymfomem (NHL) z celého světa. Diagnostika byla nejprve provedena bez imunofenotypových a genetických informací a následně s nimi. Studie prokázala, že R.E.A.L klasifikaci je možno využít u 95 % případů (Harris a kolektiv, 2000).

R.E.A.L klasifikace rozděluje lymfomy do 3 hlavních skupin: B-buněčné, T-buněčné a Hodgkinovy lymfomy a následně podskupin, které jsou uvedené v tabulce 2.

Tabulka 2: R.E.A.L klasifikace leukémií

<p>B-buněčné nádory</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prekurzory B- buněčných nádorů: prekurzorová B-lymfoblastická leukémie/lymfomu</li> <li>• Periferní B-buněčné nádory <ul style="list-style-type: none"> <li>○ B-buněčná chronická lymfocytární leukémie/prolymfocytární leukémie/malobuněčný lymfatický lymfom</li> <li>○ Lymfoplasmocytární lymfom/imunocytom</li> <li>○ Lymfom z pláštěvých buněk</li> <li>○ Folikulární lymfom - rozdělené na základě cytologie do tří podskupin: I. s malými buňkami, II. výskytem malých a velkých buněk, III. s velkými buňkami</li> <li>○ Lymfom z B-buněk marginální zóny <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ extranodální (MALT-typ +/- monocytoidní B buňky)</li> <li>▪ subtypy: splenický lymfom z B-buněk marginální zóny (+/- vilózní lymfocyty)</li> </ul> </li> <li>○ Vlasatobuněčná leukémie</li> <li>○ Plasmocytární myelom</li> <li>○ Difúzní velkobuněčný B-lymfom <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ subtypy: primární mediastinální (thymický) velkobuněčný</li> </ul> </li> <li>○ B-lymfom</li> <li>○ Burkittův lymfom</li> </ul> </li> </ul>
<p>T-buněčné a zdánlivé NK-buněčné nádory</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prekurzory T-buněčných nádorů: prekurzorová T-lymfoblastická leukémie/lymfom</li> <li>• Periferní T-buněčné nádory <ul style="list-style-type: none"> <li>○ T-buněčná chronická lymfocytární leukémie/promyelocytární leukémie</li> <li>○ Leukémie z velkých granulárních lymfocytů <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ T-buněčný typ</li> <li>▪ NK (natural killer) -buněčný typ</li> </ul> </li> <li>○ Sézary syndrom</li> <li>○ Periferní T-lymfom <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ rozdělený do cytologických kategorií: se středně velkými buňkami, s výskytem středních a velkých buněk, s velkými buňkami, s lymfoepitelovými buňkami</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ subtypy: hepatosplenický T-lymfom, podkožní T-buněčný lymfom podobný panikulitidě</li> <li>○ Angioimunoblastický T-lymfom</li> <li>○ Angiocentrický lymfom</li> <li>○ Enteropatický T-lymfom</li> <li>○ Adultní T-leukémie/lymfom</li> <li>○ Anaplastický velkobuněčný lymfom, CD30+, T- a malobuněčný typ</li> </ul>
<p>Hodgkinův lymfom</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů</li> <li>• Typ nodulární skleróza</li> <li>• Typ smíšené buněčnosti</li> <li>• Hodgkinův lymfom s deplecí lymfocytů</li> </ul>

Vzorovým příkladem charakteristiky lymfomu dle R.E.A.L klasifikace je prekursorový B-lymfoblastický lymfom. Morfologicky je charakterizován podle výskytu lymfoblastů, které jsou o něco větší než malé lymfocyty, ale menší než buňky velkobuněčného B-lymfomu. Lymfoblasty obsahují kulaté jádro s nepatrným jadérkem, jemný chromatin a slabě bazofilní cytoplazmu. Pro tumorové buňky je charakteristická především přítomnost znaků: TdT (terminální deoxynukleotid transferáza), CD19 (cluster of differentiation), CD79a a CD10, dále pak také znaky CD22 a CD20. Exprese TdT a nedostatek imunoglobulinů napomáhá k odlišení prekursorové B-lymfoblastové leukémie od více vyzrálých B-buněčných lymfomů. Z hlediska genetických projevů dochází většinou k přestavbě genů těžkých řetězců imunoglobulinů (Harris a kolektiv, 1994).

### **2.3 WHO (World Health Organization) klasifikace – klasifikace lymfomů a leukémií**

V roce 1995 ESP (European Association of Pathology) společně s SH (Society for Hematopathology) začali pracovat na nové klasifikaci hematologických malignit pro Světovou zdravotní organizaci. Tato klasifikace se zabývá malignitami z myeloidní a lymfoidní řady, dále pak malignitami odvozenými z žírných buněk a histiocytů (Harris a kolektiv, 2000).

V roce 2001 WHO klasifikace ve spolupráci s ESP a SH vydala třetí edici doplněnou o klasifikaci tumorů vycházející z hematopoetické a lymfoidní tkáně. Na základě nových

vědeckých a klinických informací vyšlo v roce 2008 čtvrté vydání s upravenými a doplněními informacemi (Vardiman a kolektiv, 2009; Chan a kolektiv, 2001).

Principem klasifikace je využití všech dostupných informací – morfologické, cytochemické, imunofenotypové, genetické a klinické vlastnosti – k definici klinicky významných projevů onemocnění (Vardiman a kolektiv, 2009; Chan a kolektiv, 2001).

Morfologické rysy zůstávají základem pro diagnózu a klasifikaci jednotlivých typů hematologických malignit. Diagnóza a klasifikace některých typů hematologických malignit, jako například podtypů Hodgkinova lymfomu, se opírá především o morfologické znaky typické pro daný typ onemocnění s podporou imunofenotypových znaků. Ovšem u jiných onemocnění, například NHL, nestačí k diagnóze a klasifikaci pouze histologická a cytologická data, a je nutné použít sofistikovanější a dražší testy, například imunohistochemický panel nebo použití průtokové cytometrie či jiné techniky (O'Brien, 2010).

S rozvojem imunohistochemických technik a průtokové cytometrie v osmdesátých letech dvacátého století došlo ke zlepšení systému klasifikace, ale jen malá část malignit má charakteristický imunofenotypový obraz, umožňující diagnostiku a zařazení. Příkladem malignity, která se dá diagnostikovat na základě imunofenotypových dat, je vlasatobuněčná leukémie, kdy dochází ke ko-expresi povrchových znaků CD11c, CD25 a CD103. Dalším problémem imunofenotypizace je, že imunofenotypové markery nebo panely markerů nejsou dostatečně citlivé ani specifické (O'Brien, 2010).

Jednou z nejdůležitějších charakteristik, která je využívána ve WHO klasifikaci, jsou genetické aberace a genetické abnormality a obzvláště důležitou informací jsou pak genetické translokace, popsané ve WHO klasifikaci. Díky novým molekulárním a genetickým technikám, jako je technika DNA čipů (aCGH – array comparative genomic hybridization), profil genové exprese (GEP – gene expression profiling) či analýza mutací, dochází k objevům nových nepatrných genetických změn – mikrolece, bodové mutace a podobně; nebo nových změn vedoucích k aktivaci/utlumení genů. Nově získaná, ale již známá genetická data, se nejspíše v budoucnu stanou základem pro klasifikaci a diagnostiku hematologických malignit (O'Brien, 2010).

Klinické projevy mají význam například pro zařazení posttransplantačních lymfoproliferativních onemocnění (PTLD). PTLD vznikají po alogenní transplantaci kmenových buněk. Na základě klinických projevů je možné odlišit primární kožní lymfomy od jejich systematických protějšků, které mají stejné morfologické, cytologické a imunofenotypové projevy, ale rozdílnou prognózu (O'Brien, 2010).

### 2.3.1 WHO klasifikace lymfomů

WHO klasifikace rozděluje lymfomy do pěti hlavních kategorií: leukémie z prekurzorových buněk, leukémie ze zralých B-buněk, T-buněk a NK (natural killer) buněk, Hodgkinovy lymfomy a lymfoproliferativní nádory spojené s imunodeficiencí. Podtypy jednotlivých hlavních skupin jsou uvedené v tabulce 3 (O'Brien, 2010).

Tabulka 3: WHO klasifikace lymfomů

<p>Leukémie z prekurzorových buněk</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• B-lymfoblastická leukémie jinak nespecifikovaná</li><li>• B-lymfoblastická leukémie s genetickými abnormalitami<ul style="list-style-type: none"><li>○ B-lymfoblastická leukémie s t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></li><li>○ B-lymfoblastická leukémie s t(v;11q23), <i>MLL</i>-přeskupení</li><li>○ B-lymfoblastická leukémie s t(12;21)(p13;q22); <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i></li><li>○ B-lymfoblastická leukémie s hyperdiploidií</li><li>○ B-lymfoblastická leukémie s hyperdiploidií (hyperdiploidní ALL)</li><li>○ B-lymfoblastická leukémie s t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i></li><li>○ B-lymfoblastická leukémie s t(1;19)(q23;q13.3); <i>E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)</i></li></ul></li><li>• T-lymfoblastická leukémie</li></ul>
<p>Malignity ze zralých B-buněk</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Chronická lymfocytická leukémie / malobuněčný lymfocytický lymfom</li><li>• B-prolymfocytická leukémie</li><li>• Splenický lymfom z B-buněk marginální zóny</li><li>• Leukémie z vlasatých buněk</li><li>• Splenický lymfom<ul style="list-style-type: none"><li>○ Splenický difúzní lymfom červené pulpy</li><li>○ Variantní leukémie z vlasatých buněk</li></ul></li><li>• Lymfoplazmocytický lymfom</li><li>• Nemoc z těžkých řetězců<ul style="list-style-type: none"><li>○ Nemoc z těžkých řetězců <math>\gamma</math></li><li>○ Nemoc z těžkých řetězců <math>\mu</math></li><li>○ Nemoc z těžkých řetězců <math>\alpha</math></li></ul></li><li>• Malignity z plazmatických buněk<ul style="list-style-type: none"><li>○ Monoklonální gamapatie neurčitěho významu</li></ul></li></ul>

- Plasmocytární myelom
- Solitární plasmocytom kosti
- Extraosální plasmocytom
- Nemoci z ukládání imunoglobulinů
- Extranodální lymfom z marginální zóny slizniční lymfoidní tkáně
- Nodální lymfom z marginální zóny
- Folikulární lymfom
- Primární kožní lymfom z folikulárního centra
- Lymfom z pláštěvých buněk
- Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL)
  - Velkobuněčný B-lymfom bohatý na T-lymfocyty a histiocyty
  - Primární DLBCL centrálního nervového systému
  - Primární kožní DLBCL „leg type“
  - Epstein-Barrové virus pozitivní DLBCL vyššího věku
- Další lymfomy z velkých B-lymfocytů
  - DLBCL spojený s chronickým zánětem
  - Lymfomatoidní granulomatóza
  - Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom
  - Primární mediastinální (thymický) velkobuněčný B-lymfom
  - Anaplastická lymfomová kináza (ALK) -pozitivní velkobuněčný B-lymfom
  - Plazmoblastický lymfom
  - Velkobuněčný B-lymfom vznikající v HVV8-pozitivní multicentrické Castlemanově nemoci
  - Primární exsudativní lymfom
- Hraniční případy
  - B-buněčný lymfom neklasifikovatelný s rysy intermediálními mezi DLBCL a Burkittovým lymfomem
  - B-buněčný lymfom neklasifikovatelný s rysy intermediálními mezi DLBCL a klasickým Hodgkinovým lymfomem

#### Malignity ze zralých T-buněk a NK-buněk

- T-prolymfocytická leukémie
- Leukémie z velkých granulárních T-lymfocytů
- Chronická lymfoproliferativní nemoc z NK-buněk

- Agresivní leukémie z NK-buněk
- EBV-pozitivní T-lymfoproliferativní onemocnění dětského věku
  - Systémová EBV-pozitivní T-lymfoproliferativní onemocnění dětského věku
  - Lymfom vzhledu hydroa vacciniiforme
- Adultní T-leukémie
- Extranodální NK/T-lymfom, nazální typ
- Enteropatický T-lymfom
- Hepatosplenický T-lymfom
- Podkožní panikulitický T-lymfom
- Mycosis fungoides
- Sézaryho syndrom
- Primární kožní CD30 pozitivní T-lymfoproliferativní onemocnění
- Primární kožní periferní T-buněčné lymfomy
  - Primární kožní  $\gamma/\delta$  T-lymfom
  - Primární kožní CD8-pozitivní agresivní epidermotropní cytotoxický T-lymfom
  - Primární kožní CD4-pozitivní T-lymfom z menších a středně velkých buněk
- Periferní T-lymfom
- Angioimunoblastický T-lymfom
- Anaplastický velkobuněčný lymfom, ALK-pozitivní
- Anaplastický velkobuněčný lymfom, ALK-negativní

#### Hodgkinovy lymfomy

- Nodulární paragranulom
- Klasický Hodgkinův lymfom
- Klasický Hodgkinův lymfom, nodulární skleróza
- Klasický Hodgkinův lymfom bohatý na lymfocyty
- Klasický Hodgkinův lymfom s deplecí lymfocytů

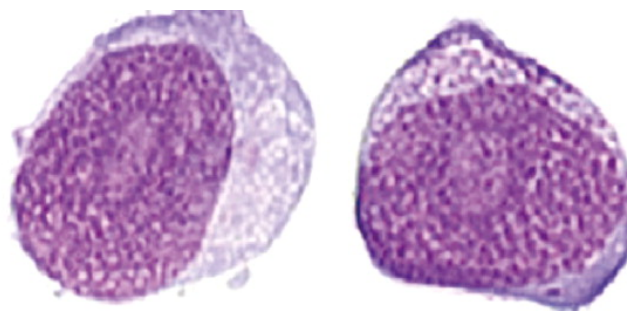
#### Lymfoproliferativní onemocnění spojené s imunodeficity

- Lymfoproliferativní onemocnění spojené s primární imunitním onemocněním
- Lymfomy spojené s HIV infekcí
- Potransplantační lymfoproliferativní onemocnění (PLTD)
  - Plazmocelulární hyperplazie a plazmocelulární hyperplázie charakteru infekční mononukleózy

- Polymorfní PLTD
- Monomorfní PLTD
- Klasický Hodgkinův lymfom typu PLTD

### 2.3.2 WHO klasifikace myeloidních onemocnění

Termín myeloidní ve WHO klasifikaci zahrnuje všechny buňky z granulocytární (neutrofilů, bazofilů a eozinofilů), monocytární, makrofágové, erytroidní, megakaryocytické řady a kmenové buňky. WHO kritéria pro myeloproliferativní neoplazie využívají informace získané z periferní krve a kostní dřeně. Získané morfologické, cytochemické a imunofenotypové informace slouží k určení buněčné linie a stupně vyžrlosti jednotlivých buněk. Stejně jako FAB klasifikace i WHO klasifikace využívá k rozdělení procentuální zastoupení blastů. Procentuální zastoupení blastů by mělo být určeno nejlépe z 200 napočítaných buněk při diferenciálním rozpočtu periferní krve a z 500 buněk při diferenciálním rozpočtu jaderných buněk v kostní dřeni. Pokud je v kostní dřeni nebo periferní krvi minimálně 20 % blastů, pak se dle WHO klasifikace jedná o akutní myeloidní leukémii. Myeloblast je buňka obsahující jádro s dobře viditelnými jadérky, s velkým cytoplazmatickým poměrem, jádro obsahuje jemný chromatin a jeho tvar je různý. Cytoplazma myeloblastu je bazofilní a mohou zde být přítomny granule nebo Auerovy tyče, jak je možné vidět na obrázku 3 (Muftić a kolektiv, 2008; Vardiman a kolektiv, 2009).



*Obrázek 3: Blasty granulocytů a agranulocytů*

*Na levé straně je blast agranulocytů, který má bazofilní cytoplazmu na rozdíl od blastu granulocytů (napravo), který má cytoplazmu azurofilní. Oba typy blastů obsahují jádro s patrnými jadérky a jemný chromatin*

Myeloidní onemocnění jsou dle WHO dělena do pěti hlavních skupin a následně do jednotlivých subtypů, viz tabulka 4 (Adam a kolektiv, 2008; Vardiman a kolektiv, 2009).



Tabulka 4: WHO klasifikace myeloidních onemocnění

<p>Myeloproliferativní onemocnění</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronický myeloidní leukémie, <i>BCR-ABL1</i>-pozitivní</li> <li>• Chronická neutrofilní leukémie</li> <li>• Polycytémie vera</li> <li>• Primární myelofibróza</li> <li>• Esenciální trombocytémie</li> <li>• Chronická eozinofilní leukémie jinak nespecifikovaná</li> <li>• Mastocytóza</li> <li>• Myeloproliferativní choroba, neklasifikovatelná</li> </ul>
<p>Myeloidní a lymfoidní onemocnění spojené s eozinofilií a abnormalitami v genech <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, nebo <i>FGFR1</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Myeloidní a lymfoidní neoplazie spojené s <i>PDGFRA</i> přeskupením</li> <li>• Myeloidní neoplazie spojené s <i>PDGFRA</i> přeskupením</li> <li>• Myeloidní a lymfoidní neoplazie spojené s <i>FGFR1</i> abnormalitami</li> </ul>
<p>Myelodysplastické / myeloproliferativní onemocnění</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronická myelomonocytární leukémie</li> <li>• Atypická chronická myeloidní leukémie <i>BCR-ABL1</i>-negativní</li> <li>• Juvenilní myelomonocytární leukémie</li> <li>• Neklasifikovatelná myelodysplastická / myeloproliferativní onemocnění</li> </ul>
<p>Myelodysplastický syndrom</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Refrakterní cytopenie s dysplazií v jedné řadě <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Refrakterní anémie</li> <li>○ Refrakterní neutropenie</li> <li>○ Refrakterní trombocytopenie</li> </ul> </li> <li>• Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty</li> <li>• Refrakterní cytopenie s dysplazií ve více řadách</li> <li>• Refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci</li> <li>• Myelodysplastický syndrom spojený s izolovanou del(5q)</li> <li>• Myelodysplastický syndrom, neklasifikovaný</li> <li>• Myelodysplastický syndrom v dětském věku</li> </ul>

## Akutní myeloidní leukémie a příbuzné onemocnění

- Akutní myeloidní leukémie s genetickými abnormalitami
  - AML s t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
  - AML s inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
  - AML s t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*
  - AML s t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*
  - AML s t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
  - AML s inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2); *RPNI-EVII*
  - AML (megakaryoblastová) s t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*
  - AML s mutací *NPM1*
  - AML s mutací *CEBPA*
- Akutní myeloidní leukémie s dysplázií více buněčných linií
- Akutní myeloidní leukémie jinak nespecifikované
  - AML s minimálně diferencovaná
  - AML bez maturace
  - AML s maturací
  - Akutní myelomonocytární leukémie
  - Akutní monoblastická a monocytická leukémie
  - Akutní erytroidní leukémie
  - Akutní megakaryocytární leukémie
  - Akutní bazofilní leukémie
  - Akutní panmyelóza s myelofibrózou
- Myeloidní sarkom
- Myeloidní proliferace spojená s Downovým syndromem

### **3 INCIDENCE A PREVALENCE NEJČASTĚJŠÍCH HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT**

Hematologické malignity jsou heterogenní skupinou onemocnění s rozdílnou incidencí, prognózou, mortalitou a etiologií. Určení celosvětové incidence jednotlivých malignit je ztíženo existencí mnoha rozdílných klasifikačních systémů a různou definicí typů onemocnění v jednotlivých zemích a také rozdílným věkem nástupu onemocnění. K určení incidence se používá věkově závislé standardizování incidence ARS (Age Standardized Rate), což umožňuje eliminovat rozdílný věk jedinců. Světový standard (W) je vztažen na 100 000 osob (Sant, 2010).

Výše zmíněné údaje jsou podrobněji diskutované v následujících podkapitolách společně se stručnou definicí jednotlivých skupin hematologických malignit.

#### **3.1 Hodgkinovy lymfomy (HL)**

Hodgkinovy lymfomy jsou nádorové onemocnění vycházející z imunitního systému, kdy dochází k abnormálnímu růstu buněk imunitního systému, a to konkrétně B-lymfocytů nacházejících se v germinálním centru lymfatických uzlin. Díky postižení imunitního systému dohází ke ztrátě obranyschopnosti organismu. Na rozvoji onemocnění se může například podílet virus Epstein-Barrové či infekční mononukleóza (O'Brien a kolektiv, 2010; [www.hodgkin.cz](http://www.hodgkin.cz) [cit. 2016-05-10]; [www.mayoclinic.org](http://www.mayoclinic.org) [cit. 2016-05-10]).

Hodgkinovy lymfomy častěji postihují muže nežli ženy, a to v poměru 3:2 a nejčastěji jsou diagnostikovány ve věku 20-34 let (National cancer institute: <http://seer.cancer.gov> [cit. 2016-05-10]).

Incidence Hodgkinových lymfomů dle HAEMACARE (The European Cancer Registry-based project on hematologic malignancies), vycházející z diagnostikovaných případů v letech 2000 – 2002 a záznamů 44 evropských onkologických registrů, byla stanovena na 2,41 případu na 100 000 obyvatel (Sant, 2010). Projekt HAEMACARE použil data z databáze EURO-CARE-4 (European Cancer Registry-based project on survival and care of cancer patients) a třetí vydání WHO klasifikace ke standardizaci incidence hematologických malignit ve 23 evropských státech (Marcos-Gragera a kolektiv, 2011).

Světová zdravotní organizace v projektu GLOBOCAN (estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012) se snažila podat co nejpřesnější odhady incidence, mortality a prevalence hlavních typů nádorových onemocnění v 184 státech světa a na jednotlivých světadílech. Výsledek projektu byl prezentován v roce 2012 a stanovuje

celosvětovou incidenci Hodgkinových lymfomů na 0,9 případů na 100 000 osob a incidence v České republice na 2,0 případů na 100 000 osob. Věkově standardizovaná incidence v jednotlivých světadílech stanovená v rámci projektu GLOBOCAN je uvedena v tabulce 5. Tabulka 6 uvádí počet nově diagnostikovaných případů Hodgkinova lymfomu a úmrtnost na tuto nemoc v roce 2012 v České republice a Evropě.

Tabulka 5: Věkově standardizovaná incidence HL na 100 000 osob na jednotlivých světadílech v roce 2012

	Evropa	Asie	Austrálie	Amerika	Afrika
ASR (W)	2,1	0,7	2,5	1,5	0,7

Tabulka 6: Počet nově diagnostikovaných případů HL a úmrtnost v 2012 v České republice a Evropě

	Počet nově diagnostikovaných případů			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
Česká republika 2012	249	147	102	40	21	19
Evropa 2012	20 410	11 066	9 344	5 887	3 430	2 457

Počet nově diagnostikovaných případů Hodgkinova lymfomu a úmrtnost na tuto nemoc v letech 2000 – 2015 v USA je uveden v tabulce 7. Můžeme vidět zvyšující se počet osob trpících Hodgkinovým lymfomem a s tím i rostoucí úmrtnost na toto onemocnění.

Tabulka 6 a tabulka 7 potvrzují fakt, že Hodgkinův lymfom častěji postihuje muže nežli ženy (GLOBOCAN 2012: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> [cit. 2016-05-10]).

Tabulka 7: Počet nově diagnostikovaných případů HL a úmrtnost v USA za posledních deset let.

Rok	Počet nově diagnostikovaných případů			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
2005	7 350	3 980	3 370	1 410	780	630
2006	7 800	4 190	3 610	1 490	770	720
2007	8 190	4 470	3 720	1 070	770	300
2008	8 220	4 400	3 820	1 350	700	650
2009	8 510	4 640	3 870	1 290	800	490
2010	8 490	4 670	3 820	1 320	740	580
2011	8 830	4 820	2 010	1 300	760	540
2012	9 060	4 960	4 100	1 190	670	520
2013	9 290	5 070	4 220	1 180	660	520
2014	9 190	5 070	4 120	1 180	670	510
2015	9 050	5 100	3 950	1 150	660	490

Prevalence Hodgkinova lymfomu v České republice a Evropě za jednoleté, dvouleté a pětileté období stanovená projektem EUCAN, zaznamenávající prevalenci, incidenci a mortality nejčastějších nádorových onemocnění. Prevalence dle Světové zdravotní organizace v roce 2012 je uvedena v tabulce 8. Tabulka 9 udává prevalenci za pětileté období na ostatních kontinentech.

Tabulka 8: Prevalence HL z roku 2012 v ČR a Evropě

	1 rok	3 roky	5 let
Česká republika	188	535	869
Evropa	13 027	37 232	59 817

Tabulka 9: Prevalence HL na světě s výjimkou Evropy za pětileté období z roku 2012

	Asie	Austrálie	Amerika	Afrika
5 let	19 785	2 490	49 058	13 266

### 3.2 Non-Hodgkinovy lymfomy (NHL)

Non-Hodgkinovy lymfomy jsou skupinou lymfoproliferativních onemocnění. Jedná se o nádorová onemocnění opět postihující a vycházející z imunitního systému, a to konkrétně z lymfocytů a daleko častěji dochází k maligní transformaci B-lymfocytů nežli T-lymfocytů. NHL jsou mnohem častěji vyskytující se hematologické malignity nežli HL, jak je možné vyčíst z následujících tabulek. Navíc u dětí jsou NHL jedny z nejrychleji rostoucích zhoubných nádorů.

WHO v projektu GLOBOCAN stanovila celosvětovou incidenci NHL na 6,0 případu na 100 000 osob a incidence v České republice byla stanovena na 6,8 případu na 100 000 obyvatel. Incidence NHL v rámci jednotlivých světadílů je uvedena v tabulce 10.

Tabulka 10: Věkově standardizovaná incidence NHL na 100 000 osob v rámci jednotlivých světadílů v roce 2012

	Evropa	Asie	Austrálie	Amerika	Afrika
ASR(W)	7,0	3,4	12,1	8,4	3,9

Počet nových případů NHL a úmrtnost na tuto nemoc v České republice a Evropě v roce 2012 je uvedena v tabulce 11. V tabulce 12 je uveden počet nových případů v roce 2005 – 2015 v USA. Zde je vidět postupně se zvyšující počet nově diagnostikovaných případů.

Tabulka 11: Věkově standardizovaná incidence NHL na 100 000 osob v rámci jednotlivých světadílů v roce 2012

	Počet diagnostikovaných případů			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
Česká republika 2012	1 278	634	644	512	268	244
Evropa 2012	101 940	54 412	47 528	42 630	23 098	2457

Tabulka 12: Počet nově diagnostikovaných případů NHL a úmrtnost v USA za posledních deset let

Rok	Nové případy			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
2005	56 390	29 070	27 320	19 200	10 150	9 050
2006	58 870	30 680	28 190	18 840	10 000	8 840
2007	63 190	34 200	28 990	18 660	9 600	9 060
2008	66 120	35 450	30 670	19 160	9 790	9 370
2009	65 980	35 990	29 990	19 500	9 830	9 670
2010	65 540	35 380	30 160	20 210	10 710	9 500
2011	66 360	36 060	30 300	19 320	9 750	9 570
2012	70 130	38 160	31 970	18 940	10 320	8 620
2013	69 740	37 600	32 140	19 020	10 590	8 430
2014	70 800	38 270	32 530	18 990	10 470	8 520
2015	71 850	39 850	32 000	19 790	11 480	8 310

Prevalence Non-Hodgkinových lymfomů v České republice a Evropě za jednoleté, dvouleté a pětileté období stanovená v projektu EUCAN Světové zdravotní organizace v roce 2012 je uvedena v tabulce 13. Tabulka 14 udává prevalenci za pětileté období na ostatních kontinentech.

Tabulka 13: Prevalence NHL z roku 2012 v ČR a Evropě

	1 rok	3 roky	5 let
Česká republika	918	2 361	3 521
Evropa	64 869	166 795	248 841

Tabulka 14: Prevalence NHL na světě s výjimkou Evropy za pětileté období z roku 2012

	Asie	Austrálie	Amerika	Afrika
5 let	260 856	14 769	258 862	32 377

### 3.3 Leukémie

Leukémie představují maligní onemocnění krvetvorné tkáně, do které patří kostní dřeň a lymfatický systém. Leukémie se dělí na akutní a chronické leukémie, lymfoblastové a myeloidní a následně další podskupiny (<http://www.mayoclinic.org> [cit. 2016-05-10]).

Celosvětová věkově standardizovaná incidence leukémií činí 5,6 případů na 100 000 osob a incidence v České republice byla stanovena v projektu GLOBOCAN na 5,9 případů na 100 000 osob. V tabulce 15 můžeme vidět incidenci leukémií v jednotlivých světadílech a v tabulce 16 počet nově diagnostikovaných leukémií a úmrtnost na tuto nemoc v České republice a Evropě v roce 2012. Tabulka 17 ukazuje počet nově diagnostikovaných případů leukémií a úmrtnost v USA za posledních deset let, kde je opět patrný nárůst počtů nových případů téměř v každém roce.

Tabulka 15: Věkově standardizovaná incidence leukémií na 100 000 osob na jednotlivých světadílech v roce 2012

	Evropa	Asie	Austrálie	Amerika	Afrika
ASR(W)	6,8	3,9	9,2	6,6	2,5

Tabulka 16: Počet nově diagnostikovaných případů leukémie a úmrtnost v 2012 v České republice a Evropě

	Počet diagnostikovaných případů			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
Česká republika 2012	1 016	571	445	786	408	378
Evropa 2012	90 391	51 097	39 294	60 055	33 124	26 931



Tabulka 17: Počet nově diagnostikovaných případů leukémií a úmrtnost v USA za posledních deset let.

Rok	Nové případy			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
2005	34 810	19 640	15 170	22 570	12 540	10 030
2006	35 070	20 000	15 070	22 280	12 470	9 810
2007	44 240	24 800	19 440	21 790	12 320	9 470
2008	44 270	25 180	19 090	21 710	12 460	9 250
2009	44 790	25 630	19 160	21 870	12 590	9 280
2010	43 050	24 690	18 360	21 840	12 660	9 180
2011	44 600	25 320	19 280	21 780	12 740	9 040
2012	47 150	26 830	20 320	23 530	13 500	10 040
2013	48 610	27 880	20 730	23 720	13 660	10 060
2014	52 380	30 100	22 280	24 090	14 040	10 050
2015	54 270	30 900	23 370	24 450	14 210	10 240

Prevalence leukémií v České republice a Evropě za jednoleté, dvouleté a pětileté období stanovená v projektu EUCAN Světové zdravotní organizace v roce 2012 je uvedena v tabulce 18 a tabulka 19 udává prevalenci za pětileté období na ostatních kontinentech.

Tabulka 18: Prevalence leukémií z roku 2012 v ČR a Evropě

	1 rok	3 roky	5 let
Česká republika	918	2 361	3 521
Evropa	64 869	166 795	248 841

Tabulka 19: Prevalence NHL na světě s výjimkou Evropy za pětileté období z roku 2012

	Asie	Austrálie	Amerika	Afrika
5 let	260 856	14 769	258 862	32 377

### 3.3.2 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

Akutní lymfoblastová leukémie je maligní onemocnění vycházející z geneticky postiženého jádra kmenových buněk. Je to onemocnění nevyzrálých T- a B-lymfocytů nebo lymfoblastů vznikající následkem jedné nebo více genetických abnormalit v lymfoblastu, vedoucí k proliferaci a akumulaci blastových buněk v kostní dřeni, což má za následek útlum

hematopoézy a sekundární anémii, trombocytopenii a neutropenií. U ALL může docházet nejen k hromadění lymfoblastů v kostní dřeni, ale i mimo ní, a to zejména ve vazivových vrstvách mozku, tzv. mozkové plně, pohlavních žlázách, brzlíku, játrech, slezině nebo lymfatických uzlinách (Pui, 1998; Schwab, 2001).

ALL tvoří přibližně 12 % ze všech diagnostikovaných leukémií u dětí a dospělých ve vyspělých státech, přičemž 60 % je diagnostikováno u lidí mladších 20 let a incidence dosahuje 4,5 případů na 100 000 dětí. Celková incidence v České Republice je 1,2 případu na 100 000 obyvatel, světová incidence činí až 4,7 případů na 100 000 obyvatel, přičemž nejvyšší incidence ALL je v USA, Švýcarsku, Itálii a na Kostarice a častěji postihuje muže (Schwab, 2001; Cetkovský, 2000; Redealli, 2005).

Ke dni 10. 5. 2016 bylo zatím v USA diagnostikováno 6 590 nových případů a 1 430 úmrtí v důsledku onemocnění ALL. Prevalence v roce 2013 byla 77 855 osob s ALL žijících v USA. Ve Velké Británii bylo v roce 2013 diagnostikováno 818 nových případů, z toho více než polovina ve věku pacientů 0 – 15 let (Cancer Research UK; National Cancer institute).

Počet nově diagnostikovaných případů a úmrtnost v USA mezi lety 2005 – 2015 je uvedena v tabulce 20.

Tabulka 20: Diagnostikované případy ALL a úmrtnost v USA za posledních deset let.

Rok	Nové případy			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
2005	3 970	2 180	1 790	1 490	850	640
2006	3 930	2 170	1 780	1 490	900	590
2007	5 200	3 060	2 140	1 420	820	600
2008	5 430	3 220	2 210	1 460	800	660
2009	5 760	3 350	2 410	1 400	740	660
2010	5 330	3 150	2 180	1 420	790	630
2011	5 730	3 320	2 410	1 420	780	640
2012	6 050	3 450	2 600	1 440	820	620
2013	6 070	3 350	2 720	1 430	820	610
2014	6 020	3 140	2 880	1 440	810	630
2015	6 250	3 100	3 150	1 450	800	650

### 3.3.2 Akutní myeloidní leukémie (AML)

Akutní myeloidní leukémie vzniká v důsledku chromozomální aberace kmenových buněk, díky čemuž dochází u myeloidních prekurzorů k poruše proliferace a diferenciaci. Následně díky hromadění abnormálních blastů dochází k poruše i ostatní krvinek, což může vést například k anémii. AML je mnohem více rozšířené onemocnění než ALL, jak vyplývá z tabulky 21 a tabulky 22 (<http://www.mayoclinic.org> [cit. 2016-05-10]; Národní informační a vzdělávací portál o onkologických onemocněních dětského věku (Bain, 2014; Cetkovský, 2007).

Akutní myeloidní leukémie postihuje spíše starší osoby, z celkového množství leukémií postihující děti tvoří pouze 15 %. Často bývá spojena s chromozomálními poruchami, jako je například Downův syndrom. V Evropě je incidence AML 3,7 případů na 100 000 osob. V roce 2013 bylo ve Velké Británii diagnostikováno 2 942 nových případů AML, a to většinou pacientům starším 70 let, celková incidence AML ve Velké Británii je 5,2 případy na 100 000 obyvatel. Dosavadní počet nově diagnostikovaných případů ke dni 10. 5. 2016 v USA bylo 19 950 a počet úmrtí způsobených tímto onemocněním byl 10 430 (Cancer Research UK; National Cancer institute).

Počet nově diagnostikovaných případů akutní myeloidní leukémie a úmrtnost v důsledku tohoto onemocnění v letech 2005 – 2015 v USA je uveden v tabulce 21. Z tabulky 21 je jasně viditelný negativní trend stoupajícího počtu nově diagnostikovaných případů AML a také stoupající úmrtnost na toto onemocnění.

Tabulka 21: Diagnostikované případy AML a úmrtnost v USA za posledních deset let.

Rok	Nové případy			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
2005	11 960	6 530	5 430	9 000	5 040	3 960
2006	11 930	6 350	5 580	9 040	5 090	3 950
2007	13 410	7 060	6 350	8 990	5 020	3 970
2008	13 290	7 200	6 090	8 820	5 100	3 720
2009	12 810	6 920	5 890	9 000	5 170	3 830
2010	12 330	6 590	5 740	8 950	5 280	3 670
2011	12 950	6 830	6 120	9 050	5 440	3 610
2012	13 780	7 350	6 430	10 200	5 790	4 410
2013	14 590	7 820	6 770	10 370	5 930	4 440
2014	18 860	11 530	7 330	10 460	6 010	4 450
2015	20 830	12 730	8 100	10 460	6 110	4 350

### 3.3.3 Chronická lymfatická leukémie (CLL)

CLL je nádorové onemocnění zralých B-lymfocytů, kdy dochází k proliferaci malých lymfocytů, které nesou povrchový znak CD5 a CD23. Tyto lymfocyty se mohou vyskytovat v kostní dřeni, lymfatických uzlinách a slezině. Tento typ leukémie vzniká pravděpodobně na podkladě genetické predispozice (Penka, 2011).

CLL je jeden z nejčastějších typů leukémie vyskytujících se v Evropě a Americe, postihující spíše starší osoby. V České republice je ročně diagnostikováno 300 – 500 nových případů CLL, a to nejčastěji u osob starších 50 let a častěji u mužů nežli u žen. V roce 2013 bylo ve Velké Británii diagnostikováno 3 442 nových případů, a to většinou u pacientů starších 70 let (www.cll.cz [cit-2016-05-17]; Cancer Research UK; <http://www.cls.cz> [cit. 2016-05-15]).

V tabulce 22 můžeme vidět poměrně vysoký nárůst nově diagnostikovaných případů CLL v Americe, zatímco počet úmrtí na tuto nemoc se příliš nemění. V roce 2016 bylo v USA diagnostikováno zatím 18 960 nových případů, což je nejvíce za posledních deset let a incidence činí 4,6 případů na 100 000 obyvatel (National Cancer institute).

Tabulka 22: Diagnostikované případy chronické lymfoblastické leukémie a úmrtnost v USA za posledních deset let.

Rok	Nové případy			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
2005	9 370	5 780	3 950	4 600	2 520	2 080
2006	10 020	6 280	3 740	4 660	2 590	2 070
2007	15 340	8 960	6 380	4 500	2 560	1 940
2008	15 110	8 750	6 360	4 390	2 600	1 790
2009	15 490	9 200	6 290	4 390	2 630	1 760
2010	14 990	8 870	6 120	4 390	2 650	1 740
2011	14 570	8 520	6 050	4 380	2 660	1 720
2012	16 060	9 490	6 570	4 580	2 730	1 850
2013	15 680	9 720	5 960	4 850	2 750	1 830
2014	15 720	9 100	6 620	4 600	2 800	1 800
2015	14 620	8 140	6 480	4 650	2 830	1 820

### 3.3.4 Chronická myeloidní leukémie (CML)

U CML dochází k maturaci buněk a produkci granulocytů. Na základě Filadelfského chromozomu dochází k abnormalitám v pluripotentních buňkách a poruše proliferace.

Chronická myeloidní leukémii tvoří pouze 2 – 5 % leukémií v dětském věku a spíše postihuje starší osoby. Více jak polovina diagnostikovaných CML ve Velké Británii je u osob starších 65 let. V roce 2013 bylo ve Velké Británii nově diagnostikováno 714 případů CML. Ke dni 10. 5. 2016 bylo prozatím v USA zaznamenáno 8 220 nových případů a 1 070 úmrtí na toto onemocnění. Celosvětová incidence CML činí v průměru mezi 1 – 2 případy na 100 000 obyvatel (Jabbour, 2014; Cancer Research UK; National Cancer institute).

V tabulce 23 je opět vidět nárůst počtu diagnostikovaných případů za posledních deset let a je zřetelné, že onemocnění častěji postihuje muže.

Tabulka 23: Diagnostikované případy chronické myeloidní leukémie a úmrtnost v USA za posledních deset let.

Rok	Nové případy			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
2005	4 600	2 550	1 960	850	430	420
2006	4 500	20 000	1 950	600	300	300
2007	4 570	2 570	2 000	490	240	250
2008	4 830	2 800	2 030	450	200	250
2009	5 050	2 930	2 120	470	220	250
2010	4 870	2 800	2 070	440	190	250
2011	5 150	3 000	2 150	270	100	170
2012	5 430	3 210	2 220	610	370	240
2013	5 920	3 420	2 500	610	340	270
2014	5 980	3 130	2 850	810	550	260
2015	6 660	3 530	3 130	1 140	590	550

### 3.4 Mnohočetný myelom (MM)

Mnohočetný myelom patří mezi malignity vycházející z lymfocytární tkáně, u něhož jsou typickým nálezem patologické plazmatické buňky v kostní dřeni a následné potlačení normální krve tvorby. Zároveň dochází k sekreci monoklonálních imunoglobulinů, nejčastěji třídy IgG nebo IgM, označované jako paraprotein (Adam, 2008; Schwab, 2001).

Celková incidence mnohočetného myelomu je 1,2 případy na 100 000 obyvatel, v České republice činí 2,1 případ na 100 000. Souhrnná incidence tohoto onemocnění na jednotlivých kontinentech je uvedena v tabulce 24.

Tabulka 24: Věkově standardizovaná incidence mnohočetného myelomu na 100 000 osob na jednotlivých světadílech v roce 2012

	Evropa	Asie	Austrálie	Amerika	Afrika
ASR(W)	2,5	0,8	3,7	2,6	1

V tabulce 25 jsou uvedené nově diagnostikované případy mnohočetného myelomu a úmrtnost na toto onemocnění v Evropě a České republice v roce 2012.

Tabulka 25: Počet nově diagnostikovaných případů mnohočetného myelomu a úmrtnost v 2012 v České republice a Evropě

	Počet diagnostikovaných případů			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
Česká republika 2012	426	226	200	328	147	181
Evropa 2012	41 719	22 042	19 695	26 346	13 390	13 300

Stejně jako u výše uvedených hematologických malignit i u mnohočetného myelomu rok od roku stoupá počet nově diagnostikovaných případů. Počet nových případů vzrostl od roku 2005 v Americe o téměř 60 %, jak je možné vidět v tabulce 26.

Tabulka 26: Počet nově diagnostikovaných případů mnohočetného myelomu a úmrtnost v USA za posledních deset let.

Rok	Nové případy			Úmrtnost		
	Celkově	Muži	Ženy	Celkově	Muži	Ženy
2005	15 980	8 600	7 380	11 300	5 660	5 640
2006	16 570	9 250	7 320	11 310	5 660	5 630
2007	19 900	10 960	8 940	10 790	5 550	5 240
2008	19 920	11 190	8 730	10 690	5 640	5 050
2010	20 180	11 170	9 010	10 650	5 760	4 890
2011	20 520	11 400	9 120	10 610	5 770	4 840
2012	21 700	12 190	9 510	10 710	6 020	4 690
2013	22 350	12 440	9 910	10 710	6 070	4 640
2014	24 050	13 500	10 550	11 090	6 110	4 980
2015	26 850	14 090	12 760	11 240	6 240	5 000
2009	20 580	11 680	8 900	10 580	5 650	4 940

Prevalence mnohočetného myelomu v České republice a Evropě, za jednoleté, dvouleté a pětileté období stanovená projektem EUCAN Světové zdravotní organizace v roce 2012 je uvedena v tabulce 27 a tabulka 28 udává prevalenci za pětileté období na ostatních kontinentech.

Tabulka 27: Prevalence mnohočetného myelomu z roku 2012 v ČR a Evropě

	1 rok	3 roky	5 let
Česká republika	289	616	785
Evropa	24 871	57 174	76 754

Tabulka 28: Prevalence mnohočetného myelomu na světě s výjimkou Evropy za pětileté období z roku 2012

	Asie	Austrálie	Amerika	Afrika
5 let	58 902	4 412	123 550	8 993

### 3.5 Závěr

Jak vyplývá z výše uvedených dat, počet nově diagnostikovaných hematologických malignit rok od roku stoupá. Nejčastěji se vyskytující skupinou hematologických malignit jsou non-Hodgkinovy lymfomy. Následují leukémie, z nichž je nejčastěji diagnostikována akutní myeloidní leukémie.

Důvodem nárůstu nově diagnostikovaných případů hematologických malignit je pravděpodobně stále se zlepšující diagnostické techniky laboratorní medicíny.

## 4 DIAGNOSTIKA

Pro stanovení správné diagnózy je nezbytné zjistit informace o morfologii, buněčném fenotypu a cytogenetických a molekulárně genetických vlastnostech, které se dají získat mnoha testy. Ačkoliv metody pro stanovení těchto informací jsou poměrně nákladné, momentálně se velmi rychle vyvíjejí (Erber, 2010).

Jednou ze základních, velmi důležitých a v praxi běžně prováděných diagnostických technik je vyšetření morfologie krevních buněk. K tomuto vyšetření se využívá světelný mikroskop. Zkušený laboratorní pracovník takto dokáže rozeznat jednotlivé typy a abnormality v buňkách. V dnešní době existují metody automatické digitální morfologie pro analýzu krevních nátěrů, ale i při tomto vyšetření je nutná fyzická kontrola laboratorním technikem. Morfologicko-cytochemické vyšetření je kvalitativní a kvantitativní vyšetření krevních elementů a slouží často k prvnímu záchytu hematologické malignity. Vyšetřovaným materiálem je periferní krev nebo kostní dřev, ze které se zhotovuje krevní nátěr obarvený tzv. Pappenheimovým panoptickým barvením. Morfologické vyšetření se neprovádí jen u buněk periferní krve, ale i buněk nacházejících se v kostní dřeví (Erber, 2010).

Mezi pokročilejší, avšak dnes již běžně využívané metody patří například průtoková cytometrie, imunochemické vyšetření, cytogenetická analýza, metody molekulární genetiky a další, které jsou popsány v následujících podkapitolách.

### 4.1 Metody využívané v klinické praxi

#### 4.1.2 Imunofenotypizace

V 60. a 70. letech 20. století došlo k charakterizaci lymfoidní řady za použití specifických antisér namířených proti povrchovým znakům. Imunofenotypizace je metoda, která identifikuje buňky právě na základě povrchových a intracelulárních antigenů = CD znaků. Využívá se zde tvorby imunokomplexu antigen-protilátka, kdy pomocí známé protilátky určujeme neznámý antigen. CD klasifikace (clusters of differentiation/designation) vznikla v roce 1982 v Paříži a v současné době obsahuje přibližně 400 CD znaků (Panczak, 2014; Penka, 2011).

K určení antigenů se mohou využívat monoklonální nebo polyklonální protilátky. Monoklonální protilátky jsou zaměřené proti jednomu konkrétnímu epitopu a jsou produkovány jedním klonem buněk, polyklonální protilátky jsou zaměřené proti skupině antigenů (Panczak, 2014; Penka, 2011).



#### 4.1.2.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je jednou z nejdůležitějších metod využívaných k diagnostice hematologických malignit. Využívá se pro imunofenotypizaci krve, aspirátu kostní dřeně a buněk získaných z lymfatické tkáně. Nicméně důležitou aplikací je kvalitativní a kvantitativní analýza jednotlivých populací krevních elementů. Díky průtokové cytometrii získáme informace o povrchových a intracelulárních znacích, typických pro jednotlivé typy buněk. Tato technika se využívá nejen k diagnostice a následné klasifikaci hematologických malignit, ale i k monitorování průběhu léčby těchto onemocnění (Erber, 2010; Penka, 2011; Jennings, 1997).

##### 4.1.2.1.1 Princip průtokové cytometrie

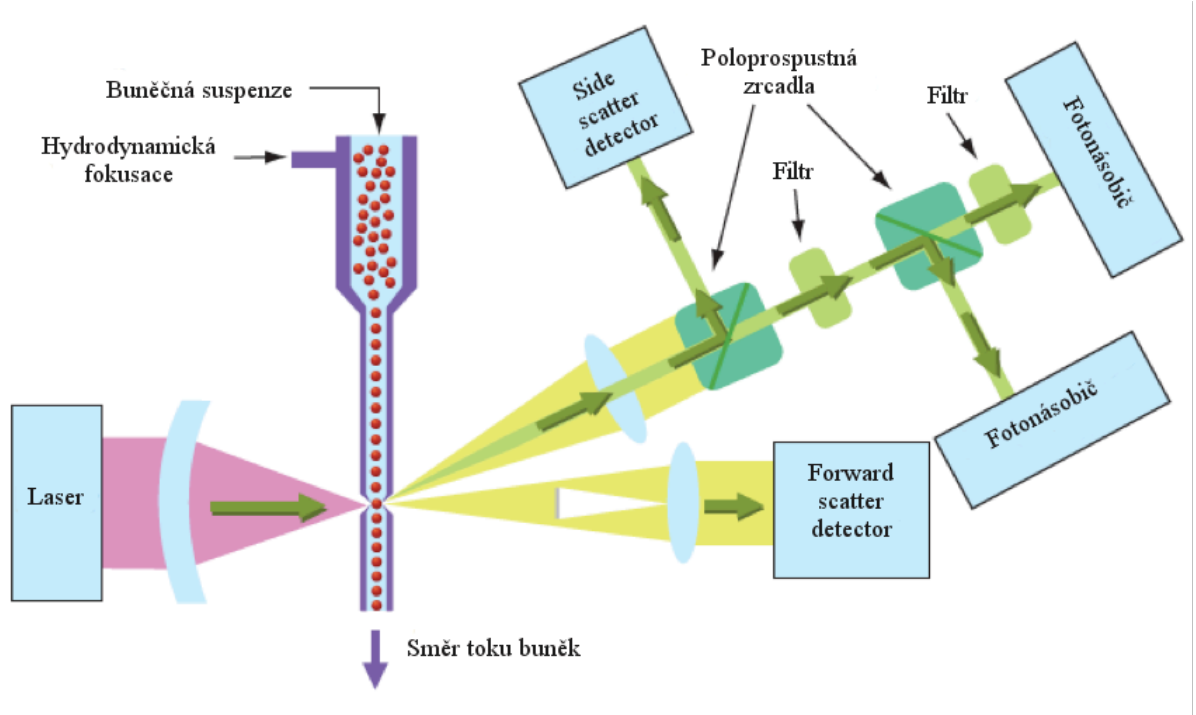
Nejprve se musí označit buňky tak, že se k suspenzi přidává jedna nebo několik protilátek, na kterých jsou navázané různé fluorochromy, schopné absorpce a následné emise ultrafialové případně viditelné části elektromagnetického záření, například FITC (Fluorescein isothiocyanate) či PE (Phycoerythrin). Takto označené protilátky se naváží na antigeny, nacházející se na povrchu nebo uvnitř buněk, a suspenze se vloží do analyzátoru. Buněčná suspenze je unášena nosnou kapalinou a dochází k hydrodynamické fokusaci. Suspenze s buňkami je pod velkým tlakem hnána přes malý otvor, a díky tomu dochází k seřazení buněk za sebou. Seřazené buňky postupně procházejí paprskem laseru o určité vlnové délce. Při průchodu buňky laserovým paprskem dochází k rozptylu světla a zároveň excitaci fluorochromu, který je konjugován s protilátkou navázanou na antigen buňky s následnou fluorescencí (Erber, 2010; Penka, 2011; Jennings, 1997; Paulík, 2005; Brown, 2000).

Průtoková cytometrie obsahuje několik detektorů: Side scatter detector (SSc) a Forward scatter detector (FSc), které zaznamenávají rozptyl laserového paprsku, a detektory na detekci fluorescenčního záření. Laserový paprsek rozptýlený pod úhlem  $0 - 18^\circ$  je zaznamenáván FSc a udává informace o velikosti buňky. Laserový paprsek rozptýlený pod úhlem  $90^\circ$  je zaznamenáván SSc a udává informaci o vnitřním prostředí buňky (Erber, 2010; Penka, 2011; Jennings, 1997; Paulík, 2005; Brown, 2000).

Existuje celá řada fluorochromů používaných pro značení protilátek proti intracelulárním a povrchovým antigenům buněk. Vlnová délka excitovaného a emitovaného záření je rozdílná u jednotlivých typů fluorochromů. Emitované záření jednotlivých fluorochromů má unikátní charakteristické spektrum, které se zaznamenává pomocí několika detektorů, jak je vidět na obrázku 4. Fluorescenční záření před dopadem na detektor ještě prochází filtry, které propouštějí paprsky jen o zvolené vlnové délce. Detektorem pro

fluorescenční záření jsou fotonásobiče, převádějící světelný signál na signál elektrický (Erber, 2010; Penka, 2011; Jennings, 1997; Paulík, 2005; Brown, 2000).

Elektrické signály ze všech detektorů jsou následně zaznamenány a vyhodnoceny počítačovým programem. (Erber, 2010; Penka, 2011; Jennings, 1997; Paulík, 2005; Brown, 2000)



Obrázek 4: Schéma konstrukce průtokové cytometrie

Rozptýlené laserové paprsky jsou zaznamenávány SSc a FSc detektorem a udávají nám informaci o vnitřní komplexitě a velikosti buňky. Emitovaná záření z fluorochromů jsou zaznamenána fluorescenčními detektory a udávají informace o vnitřních a povrchových antigenech buňky na podkladě vazby protilátek.

#### 4.1.2.1.2 Hodnocení

Data získaná z jednotlivých detektorů jsou vyhodnocena pomocí počítačového softwaru. Výsledkem analýzy je buď jednoparametrový histogram či dvouparametrový dot plot. Jelikož průtoková cytometrie analyzuje konkrétní buněčnou populaci, je nutné tuto populaci vymezit, což se provádí vytvořením takzvaného gate. Příkladem je gating s nízkým SSc a pozitivita na CD20, což je identifikace pro B-lymfocyty. Dají se nastavit i hraniční hodnoty pro odlišení normální populace buněk od atypické populace, což se využívá k odlišení neoplastických buněk a zdravých buněk. Výsledkem je hodnota udávající relativní

nebo absolutní počet buněk vykazujících pozitivitu/negativitu zvolených znaků (Erber, 2010; Penka, 2011).

#### 4.1.3 Cytogenetická analýza

Cytogenetika se zabývá studiem struktury chromozomů. Chromozomální analýza hematologických malignit a solidních tumorů byla vyvinuta přibližně před 40 lety. První popsanou cytogenetickou abnormalitou byl Filadelfský chromozom, vyskytující se u chronické myeloidní leukémie, který vzniká translokací  $t(9;22)(q34;q11)$ . Cytogenetická analýza se stává stále důležitější pro stanovení diagnózy a klasifikaci hematologických malignit. Bývá využívána především pro potvrzení předchozí diagnózy, sledování průběhu léčby a detekci relapsů onemocnění (Rooney, 2010; Wintrobe, 200; Zneimer, 2014).

Pro vyšetření chromozomálních abnormalit u hematologických malignit se využívá analýza karyotypu pomocí pruhovacích technik, což je takzvaná konvenční cytogenetická analýza, nebo molekulárně cytogenetické metody, do kterých patří FISH (fluorescein *in situ* hybridization) a její modifikace, a komparativní genomová hybridizace (CGH). Všechny techniky, společně s dalšími diagnostickými technikami, jsou běžně prováděné v rámci diagnostiky, sledování průběhů nemoci a případně relapsu hematologických malignit (Jarošová, 2012; Kuglík, 2008).

##### 4.1.3.1 Konvenční cytogenetická analýza

U klasického cytogenetického vyšetření se hodnotí počet chromozomů a jejich struktura. Metoda je založena na mikroskopické analýze metafázních chromozomů. Materiálem pro vyšetření bývá nejčastěji kostní dřeň. Materiál se odebírá do sterilní zkumavky obsahující antikoagulační činidlo heparin. Následně dochází k 24hodinové inkubaci a poté se přidává kolchicin pro inhibici dělicího vřeténka, takže buněčné dělení je zastaveno v metafázi. V dalším kroku se přidává hypotonický roztok, aby došlo ke zvětšení objemu buňky a uspořádání chromozomů do ekvatoriální roviny. Buňky je nutné fixovat, což se provádí opakovaně pomocí fixačního roztoku, obsahujícího metanol a kyselinu octovou. Buněčná suspenze se přenáší na odmaštěné podložní sklíčko a provádí se vlastní barvení, které je založeno na proteolytické činnosti trypsinu a barvení Giemsovým barvivem. Obarvený preparát se vkládá pod mikroskop, který je často vybavení kamerou pro pořízení snímku mikroskopického preparátu. Chromozomy jsou tedy snímány kamerou a následně dochází k hodnocení pomocí počítačové analýzy. Výsledek ilustrující takovouto analýzu je možné vidět na obrázku 5 (Kuglík, 2008).



Obrázek 5: Výsledek G-pruhování chromozomů u pacienta s mnohočetným myelomem

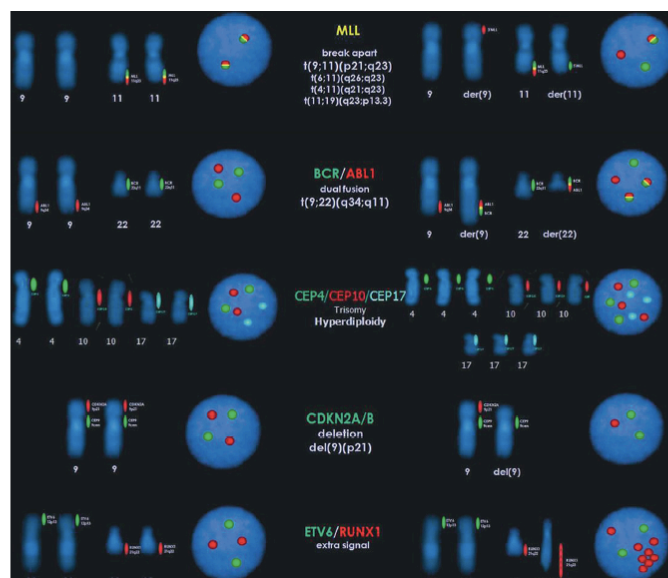
#### 4.1.3.2 Molekulárně cytogenetické metody

Mezi molekulárně cytogenetické metody patří fluorescein *in situ* hybridization (FISH) a její různé modifikace. Před použitím této metody je nutné znát cílový gen, který může být určen například pomocí Komparativní genomové hybridizace (CGH) a její modernější modifikace aCGH (array comparative genomic hybridization). Array-CGH je založena na stejném principu jako CGH. Rozdíl je v tom, že aCGH využívá namísto metafázických chromozomů krátké cílové sekvence DNA, které jsou navázané na sklíčko, tzv. DNA čipy. Array-CGH umožňuje rychlé zhodnocení změn počtu kopií velkého množství specifických sekvencí DNA. FISH i CGH vychází z výsledků konvenční cytogenetické analýzy a slouží k ověření a upřesnění patologických nálezů (Adam, 2008).

##### 4.1.3.2.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace (Fluorescein *in situ* hybridization – FISH)

Pro klasickou cytogenetickou analýzu je nutná přítomnost dělicích se buněk ve vyšetřovaném vzorku. Ovšem tento limitující faktor byl díky vyvinutí FISH metody v dnešní laboratorní diagnostice překonán. FISH metoda je výhodná zejména pro cytogenetickou analýzu u hematologických malignit, kde převažují buňky bez známek proliferace, tzv. buňky klidové (Erber, 2010).

FISH metoda analyzuje chromozomy na subcentrální úrovni v metafázi a interfázi. Materiálem je periferní krev nebo kostní dřeň. Tato technika je výsledkem spojení cytogenetické charakterizace a metod molekulární biologie, čímž dochází ke zvýšení přesnosti chromozomální analýzy. Nejprve dochází k denaturaci DNA, dojde k rozdělení dvoušroubovice DNA a následně se využívají sondy namířené proti jednovláknové DNA, které jsou komplementární se sekvencí v cílovém genu. DNA sondy jsou děleny na základě místa hybridizace na centromerické, celochromozomové a genově specifické. Sondy jsou dle konstrukce fluorescenčního mikroskopu značeny různými fluorochromy. Dochází k navázání označené sondy na místa chromozomu, která vykazují vysokou shodu homologních sekvencí. Výsledek Fluorescenční hybridizace *in situ* můžeme vidět na obrázku 6, kde je porovnán signál od zdravého jedince a osoby s patologickým nálezem (Erber, 2010; Beránek, 20016).



Obrázek 6: Výsledek metody FISH

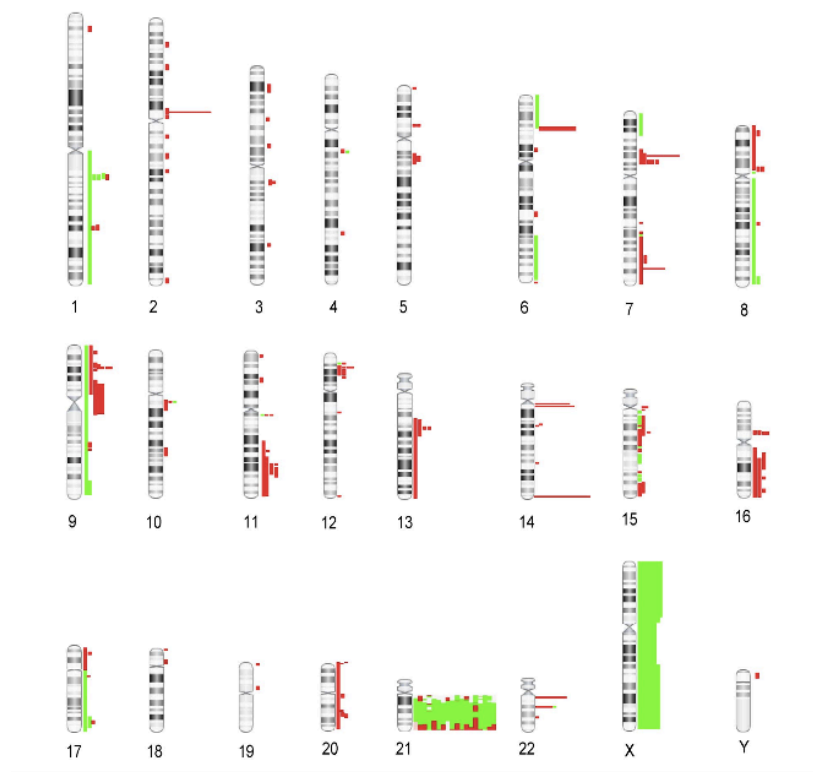
Na pravé straně je signál u vzorku od zdravého jedince a na straně levé je signál u vzorku s výskytem abnormalit.

#### 4.1.3.2.2 Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Komparativní genomová hybridizace (CGH) je metodou molekulárně cytogenetickou, umožňující detekci počtu kopií jednotlivých sekvencí v genomu. Modernější a v dnešní době častěji používanější je spojení CGH techniky s DNA mikročipy, tedy array komparativní genomová hybridizace (aCGH). CGH metoda v zásadě využívá základního principu FISH metody (Weiss, 1999; Cagle, 2010).

Ze vzorků leukemických buněk se získá DNA, která je označena pomocí barevně odlišných fluorochromů. Takto označená DNA je následně smíchána s rozdílně označenou referenční DNA a dochází ke kompetitivní hybridizaci na mikročipy. Nenavázané sondy jsou vymyté. Rozdíl fluorescence mezi referenční a patientskou DNA je měřen a zaznamenáván. Pomocí počítačových programů dochází k vyhodnocení a stanovení, zda došlo ke ztrátě nebo získání genetické informace u sledované DNA (obrázek 7) (Erber, 2010; Rand, 2011).

Další alternativou jsou SPN (single nucleotide polymorphism) čipy, které mohou být využity k charakterizaci bodového polymorfismu v lymfoblastech u pacientů trpících leukémií. Tato metoda se zatím v praxi nepoužívá, ale má význam pro odhalování nových chromozomálních abnormalit v rámci experimentální práce (Erber, 2010).



*Obrázek 7: Výsledek GCH metody*

*Globální abnormality vyskytující se IAMP21 genomu, které jsou detekované metodou komparativní genomové hybridizace. Zeleně zbarvené plochy získané genetické informace, naopak červené plochy jsou ztracené.*

#### 4.1.4 Metody molekulární genetiky

Metody molekulární genetiky jsou v dnešní době hojně využívané v klinické praxi. Lze pomocí nich detekovat velké množství genetických abnormalit, vyskytujících se u hematologických malignit. Základní využívanou technikou je polymerázová řetězová reakce (PCR). Tato metoda je rychlá, nepříliš drahá a dokáže z poměrně malého množství vzorku vytvořit velký počet kopií vyšetřované DNA. Metoda se využívá v mnoha modifikacích a navazují na ni další specializované metodiky (Turgeon, 2005).

##### 4.1.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

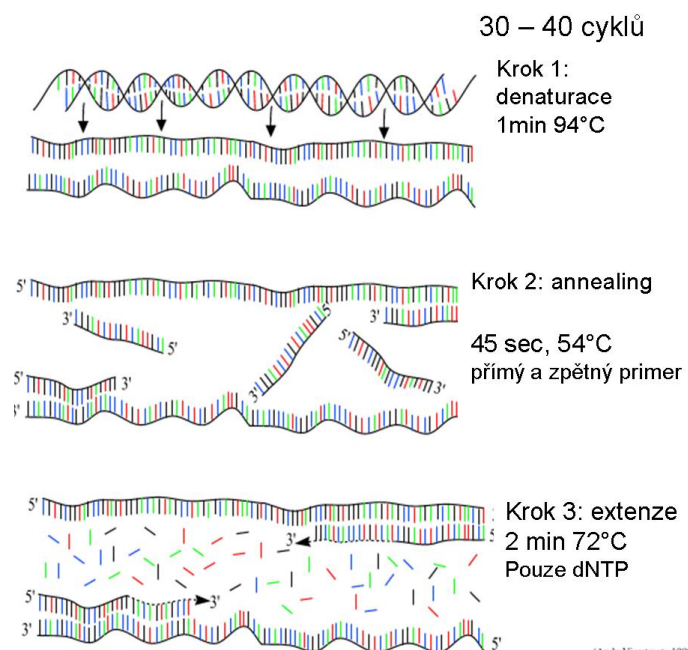
Polymerázová řetězová reakce je metoda, která využívá schopnosti DNA denaturovat a opět renaturovat a umožňuje rychlou amplifikaci specifických úseků DNA, takže dojde k vytvoření tisíců kopií stejné sekvence.

Prvním krokem PCR je extrakce DNA z klinického materiálu, která bude sloužit jako templát pro amplifikaci. Následuje samotná metoda PCR, která se skládá ze tří kroků: denaturace, annealing a extenze (obrázek 9).

Denaturace dvoušroubovice DNA probíhá při teplotě kolem 95 °C. Následuje ochlazení materiálu na 50 – 60 °C a dochází k annealing, přiblížení a nasednutí primerů, krátkých řetězců nukleotidů, na 3' konec cílové DNA. Posledním krokem je extenze, ve které dochází k syntéze DNA, díky enzymu polymeráze, kterou je v PCR *Taq* polymeráza. Pro dosažení dostatečného množství kopií DNA ze vzorku se celý cyklus 30krát až 40krát opakuje (Paulík, 2005; Erber, 2012; White, 1989).

Existuje řada modifikací PCR, mezi které patří AS-PCR (Alelově specifická PCR), metoda alelové diskriminace. Využívá primerů s nukleotidy, které jsou komplementární s hledanou mutací či primerů pro úsek, odlišující hledanou alelu od ostatních. V klinické praxi se AS-PCR využívá například pro detekci mutace V617F cytoplazmatické Janusovy tyrozin kinázy 2 (JAK2), která se vyskytuje u myeloproliferativních onemocnění (Beránek, 2016; Yuryev, 2007; Kralovic, 2006).

Další modifikací je multiplex PCR, využívající několika párů primerů, což umožňuje vznik více typů ampliconů, lišících se svojí délkou. V klinické praxi se používá pro detekci přeskupení v genech pro imunoglobuliny a receptory T-lymfocytů, které se vykytují u akutních lymfoblastových leukémií (Beránek, 2016; Folber, 2013).



Obrázek 8: Schéma PCR

Nejprve dochází k denaturaci cílové DNA, následuje nasednutí primerů a syntéza nové DNA. Výsledkem je vytvoření kopií vyšetřované DNA.

#### 4.1.4.2 Detekce produktů PCR

Nejstarší metodou detekce produktů PCR je gelová elektroforéza. Tato metoda využívá migrace PCR produktů v agarosovém gelu v prostředí jednosměrného elektrického proudu. Působením proudu dochází k rozdělení jednotlivých fragmentů DNA na základě jejich velikosti. Čím menší je fragment DNA, tím rychleji se pohybuje v prostředí gelu a tím dále od startu se tedy nachází. Pro vizualizaci se využívá ethidium bromide, který se váže na DNA a fluoreskuje pod ultrafialovou lampou (Erber, 2012; Brown, 2015).

Další možností detekce je využití polyakrylamidového gelu, poskytující přesnější výsledky než za použití agarosového gelu. Polyakrylamidové gely se používají v uspořádání pro klasickou elektroforézu. Mnohem častější je ale jejich využití v genetických analyzátoch při kapilární elektroforéze (Erber, 2012; Brown, 2015).

#### 4.1.4.3 Sangerovo přímé sekvenování

Genetické analyzátory založené na kapilární elektroforéze se využívají jak pro detekci jednotlivých fragmentů PCR, tak pro přímé Sangerovo sekvenování. U této metody je klasická PCR následována sekvenační PCR, kdy do reakční směsi jsou kromě běžných dNTP přidány fluorescenčně značené ddNTP, každá báze je značena jiným fluoresceinem. Při



vřazení ddNTP do vznikajícího amplikonu dojde k jeho ukončení. Výsledkem je směs různě dlouhých fragmentů, vždy zakončených barevně značeným ddNTP. V kapiláře genetického analyzátoru jsou tyto fragmenty srovnány podle své velikosti od nejmenších po největší. Při průchodu koncem kapiláry jsou různé barvy konečných fluoresceinů detekovány laserem. Tím jsou identifikovány postupně jednotlivé báze analyzované DNA (Beksaç, 2007).

Pomocí této metody je možné detekovat bodové mutace v celé délce testovaného amplikonu. Metoda se v molekulární genetice využívá velmi široce, v diagnostice hematologických malignit slouží například k detekci mutací v kinázové doméně BCR-ABL, které u pacientů s chronickou myeloidní leukémií způsobují rezistenci na léčbu tyrosin-kinázovými inhibitory (Beksaç, 2007).

#### 4.1.4.4 Kvantitativní PCR

PCR je využívána také pro kvantitativní sledování množství cílových genů nebo jejich exprese. Dříve byla pro tyto účely používána nejčastěji nested PCR. Metoda je tvořena dvěma kroky: Nejprve je templátem sama vyšetřovaná DNA, v druhém kroku je pak templátem produkt PCR, vzniklý v prvním kroku. Tímto procesem dojde ke zvýšení citlivosti metody. Metoda může sloužit například k detekci *BCR-ABL1*, vyskytující se u chronické myeloidní leukémie, *PML-RARA* akutní promyelocytární leukémie či *FIP1L1-PDGFR* pozitivní u chronické eosinofilní leukémie (Javanovic, 2007; Quintás-Cardama, 2009; Tallman, 1998; Beránek, 2016).

V dnešní době je tato metoda většinou nahrazena real-time PCR, která je aktuálně nejčastější metodou pro kvantitativní sledování exprese genů a to v uspořádání RT real-time PCR (reversní transkripce a následná polymerázová řetězová reakce v reálném čase). Výchozím materiálem této metody je RNA buněk, která je reversní transkripcí přepsána do cDNA. Ta je pak využita jako templát real-time PCR (Erber, 2012).

Metoda real-time PCR umožňuje sledování množství výsledného PCR produktu v reálném čase pomocí sledování nárůstu fluorescence v jednotlivých cyklech reakce. Pro sledování fluorescence jsou do reakční směsi PCR přidány fluorescenční sondy, které se vážou na amplifikovanou DNA. Vlastní PCR pak probíhá ve speciálních termocyklerech se snímači fluorescence (Erber, 2012).

Metoda RT real-time PCR umožňuje sledování mnoha molekulárních biomarkerů.

#### 4.1.4.5 Sledování molekulárních biomarkerů

Metoda RT real-time PCR umožňuje kvantitativní detekci mnoha molekulárních biomarkerů. Molekulární biomarkery slouží ke sledování průběhu léčby a pro monitorování

minimální reziduální nemoci. V rámci sledování biomarkerů u hematologických malignit se například detekuje exprese genů ERG, EVI1, MNI1, NPM1, BAALC, PRAME nebo mutace v genech NPM1, CEBPA, TP53 a dalších (Cilloni, 2002; Trka, 2002).

Kvantitativní stanovení exprese genu WT1 pomocí real-time PCR je využíváno u pacientů s akutními leukémiemi a myelodysplastickými/myeloproliferativními neopláziemi pro sledování terapie a reziduální nemoci (Cilloni, 2002; Trka, 2002).

K vyšetření mutací v genu NPM1 se využívá přímé sekvenování. NPM1 gen se vyskytuje u několika chromosomálních translokací spojených s rozvojem leukémií. Výsledkem translokace v genu NPM1 je možná cytoplazmatická dislokace proteinu, což pravděpodobně hraje zásadní roli v maligní transformaci. K mutacím v tomto genu dochází během akutní lymfoblastické i myeloidní leukémie a lze ji využít ke stanovení prognózy těchto malignit (Thiede, 2006).

Gen ERG (erythroblast transformation-related gene) se nachází na 21. chromozomu. U dětí s trisomií 21, tudíž dětí trpícím Downovým syndromem, zvyšuje riziko vzniku akutní megakaryoblastické leukémie. U zdravého jedince je nezbytný pro normální průběh megakaryopoézy. ERG může být zapojen i do onkogeneze a to generováním fúzních genů s FUS/TLS (Fused in Sarcoma/Translocation in Sarcoma) u akutní myeloidní leukémie. U dospělých lidí je zvýšená exprese ERG genu spojena s akutní myeloidní leukémií a akutní T-lymfatickou leukémií. K detekci exprese genu ERG na úrovni mRNA se využívá RT-PCR (reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce) (Tsuzuki, 2011; Goldberg, 2013).

Zvýšená exprese genu EVI-1 je spojená s akutní myeloidní leukémií a ke stanovení exprese tohoto genu na úrovni mRNA se opět používá RT-PCR (Lugthart, 2008; Ho, 2013).

Expresí genu BAALC je jedním z prognostických faktorů u akutní myeloidní leukémie s normálním cytogenetickým nálezem (CN-AML). V současné době je to jeden z nejlepších molekulárních markerů u CN-AML. Primární AML s normálním cytogenetickým nálezem se vyskytuje u 45 % pacientů mladších 60 let trpících AML. Tento gen se nachází na 8. chromozomu a je jedním z markerů raných progenitorových buněk. K vyšetření exprese genu se opět používá RT-PCR nebo se využívají mRNA čipy (Langer, 2008).

## 4.2 Metody využívané pro výzkumné účely

### 4.2.1 Metody proteomiky

Proteomika je obor, využívající techniky hmotnostní spektrometrie a její modifikace či dvourozměrné gelové elektroforézy k detekci proteinů. Zabývá se analýzou proteinů, jednotlivých typů jejich posttranslačních modifikací, vzájemných interakcí proteinů a může být využita k lokalizaci proteinů v buněčných organelách. Umožňuje charakterizovat proteiny, které jsou zapojeny do vzniku a vývoje hematologických malignit. Díky tomuto oboru došlo a stále dochází k identifikaci biomarkerů, což lze využít pro diagnostiku malignit v jejich raném stádiu. V současné době jsou metody proteomiky využívané zejména pro výzkumné účely (Cristea, 200; Issaq, 2002; Penka, 2001; Cibula, 2009).

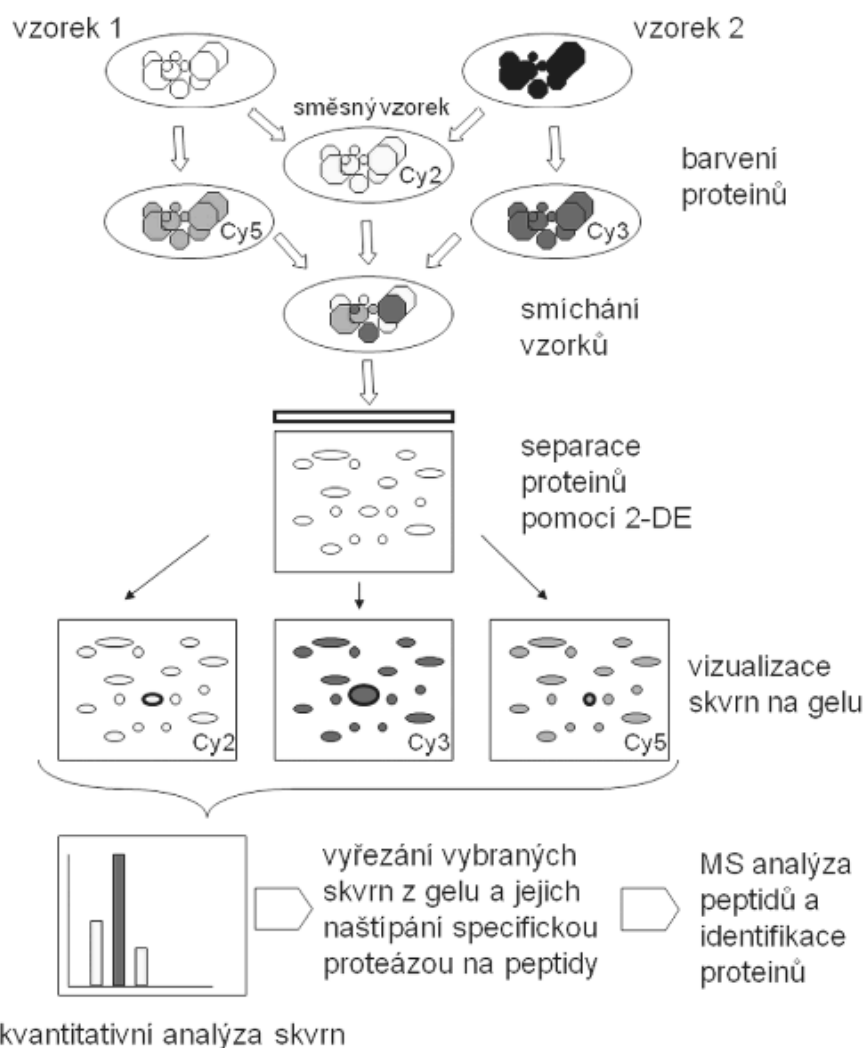
#### 4.2.1.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D-DE)

Tato technika využívá dvou odlišných fyzikálně chemických vlastností bílkovin: rozdílů v jejich velikosti a izoelektrickém bodě.

Nejprve dochází k přenesení proteinů do vhodného prostředí. Následuje první rozměr elektroforetické separace, kdy metodou izoelektrické fokusace dochází k separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu s imobilizovaným gradientem pH. Tedy separaci proteinů na základě jejich izoelektrického bodu – hodnoty pH, při kterém je součet nábojů daného proteinu nulový. Ve druhém rozměru je proužek gelu přenesen na separační gel a dochází k rozdělení bílkovin na základě jejich relativní molekulové hmotnosti, principem SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přítomností dodecylsírany sodného). Tímto způsobem lze rozlišit více než 5 000 proteinů, ale nevýhodou je množství směsných spotů („skvrn“), které obsahují proteiny se stejnou molární hmotností a izoelektrickým bodem. K vizualizaci se používají specifické barvicí nebo značící techniky (Cibula, 2009; Tomancová, 2009; Vítámvás, 2009; Cellulaire, 2002; Cristea, 2004).

Moderní modifikací 2D-DE je dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza. Metoda 2D-DE při analýze proteinů je zobrazena na obrázku 9. U této techniky nejprve dojde ke kovalentnímu označení proteinů fluorescenčními značkami. Označení nám umožňuje na jednom proužku gelu současně separovat dva vzorky a navíc směsný vzorek, sloužící jako interní standart. Každý vzorek je označen fluorescenční značkou emitujícího a excitujícího záření o různé vlnové délce. Následuje separace podle 2D-DE. Díky paralelnímu separování dvou vzorků a směsného vzorku na gelu dochází ke zvýšení reprodukovatelnosti metody. K závěrečné detekci se využívají fluorescenční scannery nebo CCD (Charge-coupled device,

tedy kamery a speciálním softwarem) a dochází ke kvalitativnímu hodnocení získaných snímků. Lze tak zjistit kvalitativní a kvantitativní rozdíly proteinových vzorků mezi sebou při minimalizaci problémů spojených s reprodukovatelností elektroforetických analýz. Následně dochází k vyříznutí vzorku z gelu a proteiny obsažené v jednotlivých skvrnách se nejčastěji identifikují pomocí hmotnostní spektrometrií (Cibula, 2009; Tomancová, 2009; Vítámvás, 2009; Cellulaire, 2002; Cristea, 2004).



Obrázek 9: Schéma analýzy proteinů metodou 2D-DIGE

Před dvourozměrnou elektroforézou se dva vzorky proteinů a jeden smíšený vzorek použitý jako interní standard označí rozdílnou fluorescenční značkou. Tyto vzorky se společně rozdělí na témže gelu a pak se analyzují při třech rozdílných vlnových délkách. Lze tak zjistit kvalitativní a kvantitativní rozdíly proteinových vzorků mezi sebou při minimalizaci problémů spojených s reprodukovatelností elektroforetických analýz. Vybrané skvrny

vykazující rozdílnou kvantitu mezi vzorky se následně vyřežou z gelu a proteiny obsažené v jednotlivých skvrnách se identifikují hmotnostní spektrometrií.

#### 4.2.1.2 Hmotnostní spektrometrie

V hematologii je hmotnostní spektrometrie používána pro identifikaci proteinů, peptidů a sekvencí DNA. Využívá se ke studiu skladby proteinů, analýze nekovalentních vazeb, posttranslačních modifikací a k identifikaci nových dosud nepopsaných proteinů. Existuje řada modifikací této techniky, například SELDI-ToF MS (surface-enhanced laser desorption ionization mass spectrometry). Při této technice dochází k interakci proteinů a peptidů ze vzorku s čipy. Následuje opakované promytí, při kterém dojde k pozitivní selekci cílených proteinů. Vyselektované proteiny navázané na čipech jsou ionizovány pomocí laseru. Vzniklé ionty jsou měřeny pomocí ToF (time of flight) analyzátoru hmotnostní spektrometrie. Výsledkem je hmotnostní spektrum analyzovaných proteinů. (Cristea, 2004; Davis, 2004)

Další modifikací hmotnostní spektrometrie je MALDI-ToF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization), kdy dochází ke smíchání proteinů či peptidů s matrixem absorbujícím záření o známé vlnové délce. Směs vzorku s matrixem se umístí na vhodnou podložku a dojde k ozáření laserem a opět dochází k ionizaci vzorku. K detekci vzniklých iontů se používá ToF analyzátor, který měří dobu letu částic ve vakuu, které jsou urychlené elektrickým polem. Rychlost pohybu částic ve vakuu je dán jejich hmotností a nábojem. Výsledkem je opět hmotnostní spektrum. (Havliš, 1999; Cristea, 2004; Davis, 2004)

#### 4.2.1.3 Proteinové čipy

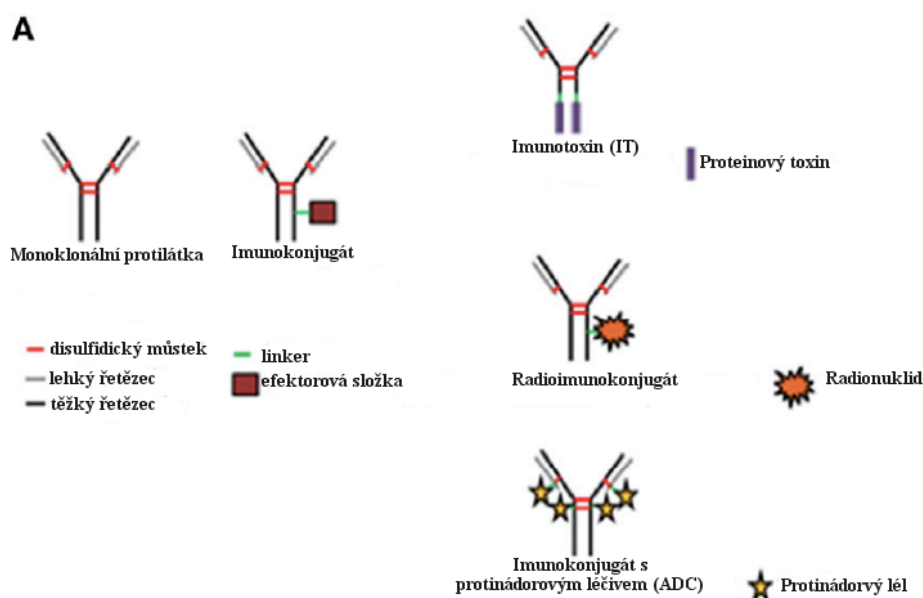
Proteinové čipy dnes představují technologii, která teprve získává své místo v diagnostických laboratořích. Tato technika se v budoucnosti pravděpodobně bude využívat především k záchytu markerů hematologických malignit. Pomocí klasických biočipů je možné testovat několik proteinů současně s využitím minimálního množství biologického vzorku. Zmíněné systémy jsou charakteristické svojí unikátní konstrukcí. Na pevném materiálu s chemicky modifikovaným povrchem jsou navázané imobilizované proteinové čipy, které jsou tvořeny značenými proteiny (například protilátkou nebo antigenem). Na tyto imobilizované proteinové čipy se naváží proteiny ze vzorku. K detekci se využívá fluorescenční nebo chemiluminiscenční záření. Může se využít jak kompetitivní uspořádání imunochemických čipů, tak sendvičové uspořádání. Stanovení proteinů je jak kvantitativní, tak i kvalitativní (Havliš, 1999; Cristea, 2004; Davis, 2004).

## 5 TERAPIE

Po stanovení diagnózy dochází k rozhodnutí o způsobu léčby hematologických malignit. Terapie může být symptomatická, kdy se neléčí samotná příčina onemocnění, ale pouze symptomy. Dalším typem je kurativní léčba, jejímž cílem je úplné vyléčení malignity. Také je třeba zvážit, zda léčba musí začít okamžitě, nebo je možno počkat na plné dovršení všech prognostických znaků. Mezi základní možnosti léčby patří: standardní chemoterapie, chemoterapie s cílem provedení alogenní transplantace, podání medikamentů, pouze symptomatická léčba nebo experimentální léčba novými léky. (Adam, 2008)

### 5.1 Imunoterapie

Jednou z možností léčby hematologických malignit je použití monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky se využívají buď samostatně nebo s navázanou efektorovou skupinou - imunokonjugáty. Imunokonjugáty (immunoconjugates – ICs), jsou rozdělené do tří skupin na základě efektorové složky: imunotoxiny (IT - immunotoxin), radioimunokonjugáty (RIC – radioimmunoconjugate) a protilátky konjugované s protinádorovými léčivy (ADC – antibody–drug conjugate). Jednotlivé typy imunokonjugátů jsou znázorněny na obrázku 10 (Palamca-Wessels, 2014).



Obrázek 10: Imunokonjugáty

Na levé straně je monoklonální protilátka bez navázané efektorové skupiny, vedle protilátka s navázanou efektorovou skupinou. Efektorová skupina se váže na těžké řetězce protilátek s výjimkou ADC, kde je navázán na lehkém řetězci protilátky.

### 5.1.2 Nekonjugované monoklonální protilátky

Účinkem nekonjugovaných monoklonálních protilátek může být indukce apoptózy, inhibice tvorby proteinů nezbytných pro maligní buňky, inhibice proliferace maligních buněk nebo ovlivnění účinnosti cytostatik (Cwiertka, 2004).

Jednou z nejvýznamnějších protilátek k léčbě hematologických malignit je anti-CD20. Anti-CD20 se váže na membránový glykoprotein CD20, který je exprimován na maligních i zralých zdravých B-lymfocytech. I když funkce CD20 molekuly prozatím není zcela známá, pravděpodobně aktivuje lymfocyty, reguluje buněčnou diferenciaci a podílí se na transmembránovém přenosu vápníku. Po navázání protilátky na glykoprotein dochází k zániku buňky, a to nejspíš v důsledku komplement dependentní cytotoxicity, protilátkově závislé buněčné cytotoxicity nebo indukci apoptózy. (Mayer, 2003; Dübel, 2014; Kelner, 2013).

Při komplement dependentní cytotoxicitě vznikne imunokomplex antigen – protilátka (anti-CD20 – CD20), což vede k aktivaci kompletu. Komplement je soustava sérových proteinů (C1 – C9) a membránových proteinů. Komplementový protein C1 rozezná imunokomplex a naváže se na komplex antigen protilátka. Výsledkem vazby je kaskáda reakcí, při které dochází k postupnému štěpení proteinů C2, C3 a C5. Díky této kaskádě se fragmenty C5 zanoří do membrány buňky a připojí se k nim proteolytické proteiny C9. V buněčné membráně vznikají póry a dochází k úniku cytoplazmatických komponentů, což vede k narušení osmotické rovnováhy a k lýze buňky (Hořejší, 1998).

U protilátkově závislé buněčné cytotoxicity jsou vznikem imunokomplexu aktivovány NK (natural killer) buňky. NK buňky se naváží na komplex anti-CD20 – CD20 a začnou produkovat granula, která penetrují membránu B-buněk, napadají a ničí buněčné jádro, což opět vede k jejich zániku (Hořejší, 1998).

Také může dojít k apoptóze neboli programované buněčné smrti. Vzniklý imunokomplex spustí signalizační kaskádu zahrnující aktivaci kaspázy, destrukci cytoskeletu, zástavu replikace a reparace DNA. Dochází ke smrštění buňky a štěpení DNA endonukleázami. Výsledkem je vznik apoptických tělísek, které jsou odstraňovány fagocyty (Hořejší, 1998; Otová, 2013).

Anti-CD20 se využívá k léčbě B-buněčných lymfomů, folikulárních lymfomů či k léčbě autoimunitních onemocnění jako je autoimunitní cytopenie (Kheirallah, 2010).

Nevýhodou při použití nekonjugované anti-CD20 je nepřítomnost CD20 receptorů u nezralých lymfoidních buněk, takže dochází k opětovnému nahrazení zničených buněk. Z tohoto důvodu se více využívají imunokonjugáty (Dübel, 2014; Kelner, 2013).

### 5.1.3 Radioimunokonjugáty

Radioimunoterapie využívá cytotoxicity některých radioizotopů, které jsou navázané na monoklonálních protilátkách. Radioimunoterapie využívá vysokých koncentrovaných dávek radiace. V současné době se v praxi běžně využívají protilátky, velmi často anti-CD20, s navázaným radionuklidem jódu  $^{131}\text{I}$  a radionuklidem yttria  $^{90}\text{Y}$  k léčbě například B-buněčných non-Hodgkinových lymfomů. Velmi často se pro tvorbu radioimunokonjugátů používají protilátky anti-CD20 (Dahle, 2007).

Radioimunokonjugát, skládající se z anti-CD20 a radioizotopu, se váže na CD20 receptor lymfatických buněk a dochází k uvolnění radioaktivnímu záření. Díky radiaci není napadena pouze buňka, na kterou se imunokonjugát naváže, ale i buňky v okolí.

Anti-CD20 s kovalentně vázaným radioaktivním izotopem jódu  $^{131}\text{I}$  se využívá k léčbě především CD20 pozitivních folikulárních non-Hodgkinových lymfomů a to hlavně u relapsů těchto onemocnění (Bennett, 2005).

Anti-CD20 s navázaným radioaktivním izotopem yttria  $^{90}\text{Y}$  je využíván k léčbě non-Hodgkinových lymfomů (Price, 2014).

Radioimunoterapie slouží především pro přípravu pacienta na alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk, kdy radioimunokonjugáty způsobují myeloablaci, tedy apoptózu hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni pacienta (Price, 2008).

### 5.1.4 Imunotoxiny

Imunotoxiny se skládají z buněčného ligandu, na který je kovalentní vazbou vázán peptidový toxin. Buněčným ligandem je zpravidla monoklonální protilátka, která se specificky váže na povrchový antigen maligních buněk. Po navázání dochází k translokaci toxinu přes membránu. Následuje usmrcení cílové buňky díky toxinu, který způsobuje katalytickou inaktivaci životně důležitých buněčných procesů nebo modifikaci buněčného povrchu nádorové buňky (Frankel, 2003).

Příkladem imunotoxinů, využívajících se k léčbě hematologických malignit, jsou difterický toxin a exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa*, tedy toxiny s transferázovou aktivitu. Exotoxin A a difterický toxin katalyzují přenos adenosindifosfát ribózy (ADP-ribózy). Při tomto procesu dojde k přenosu ADP-ribózy z nikotinamidadenindinukleotidu na elongační faktor. Ten je nezbytný pro vznik polypeptidových řetězců bílkovin. Navázáním ADP-ribózy na elongační faktor dochází k jeho inhibici elongačního faktoru a tudíž k zástavě syntézy proteinů. Výsledkem působení toxinu je apoptóza buňky (Foss, 2005; Fitzgerald, 2011; Figgitt, 2000; Lee, 1984).



Pro léčbu kožního T-buněčného lymfomu (CTCL – cutaneous T cell lymphoma) se využívá difterický toxin navázaný na anti-interleukin 2. Na povrchu T-buněk jsou přítomny receptory pro interleukin 2 (IL2). Po navázání IL2 na receptor je spuštěna signální kaskáda vedoucí k proliferaci buňky. Imunotoxin inhibuje proliferaci a zároveň indukuje apoptózu (Foss, 2005; Fitzgerald, 2011; Figgitt, 2000).

Imunotoxin, který se využívá pro léčbu vlasatobuněčné leukémie (HCL) s lékovou rezistencí je složen z protilátky anti-CD22 a exotoxinu A *Pseudomonas aeruginosa*. Imunotoxin se naváže na CD22 a inhibuje syntézu proteinů, což vede k apoptóze buňky. (Fitzgerald, 2011; Verma, 2015).

#### 5.1.5 Imunokonjugáty s protinádorovými léčivými (ADCs)

ADCs představují nejvyužívanější skupinu imunokonjugátů a jsou cílené především na buňky CD19+, CD22+, CD33+ a CD79b+ (Palanca, 2014).

Pro léčbu AML (zejména u relapsů onemocnění), B-buněčné ALL a HCL se využívají protilátky s navázaným calicheamicinem. Imunokonjugát s protilátkou (anti-CD33 u AML a HCL, anti-CD22 u ALL) se naváže na povrch maligní buňky. Následuje internalizace a translokace imunokonjugátu do endozomu a lysozomu. V lysozomu dojde díky nízkému pH k oddělení calicheamicinu od protilátky. Calicheamicinu se redukuje na aktivní formu a v buněčném jádru je vázán na DNA. Po navázání produkuje diradikál p-benzenu, což způsobuje zlomy v dvoušroubovici DNA a tím maligní buňka zaniká. (Grawunder, 2017; Safdar, 2011; Dübel, 2014; Palanca-Wessels, 2014)

K léčbě Hodgkinova lymfomu a anaplastických velkobuněčných lymfomů, a to především u relapsů těchto onemocnění, se dá využít ADC složeného z anti-CD30 a malé molekule monomethyl auristatinu E (MMAE). Pomocí protilátky anti-CD33 dochází k navázání na CD33+ buňky, následuje internalizace ADC do buňky a transportu do lysozomu, kde dochází k rozštěpení. MMAE se dostává z lysozomu a inhibuje polymeraci tubulinu, čímž dochází k zastavení mitózy v profázi. Nedochází tedy k proliferaci buňky a buňka zaniká apoptózou (Younes, 2010; Palanca-Wessels, 2014; Phillips, 2012; Francisco, 2013).

## **5.2 Alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT – hematopoietic stem cell transplantation)**

Výhodou krvetvorných kmenových buněk je jejich schopnost samostatně se obnovovat a diferenciovat do jednotlivých typů krevních buněk (Rovan, 2010).

Alogenní HSCT je potenciální léčbou pro pacienty s relapsem onemocnění s vysoce rizikovými hematologickými malignitami, ale i pro pacienty s dědičným či získaným onemocněním imunitního a hematopoetického systému. V případě hematologických malignit se provádí HSCT především u pacientů trpících akutní myeloidní leukémií, akutní lymfoblastickou leukémií, chronickou myeloidní leukémií, myelodysplastickým syndromem, myeloproliferativním onemocněním, non-Hodgkinovým lymfomem, Hodgkinovým lymfomem, chronickou lymfatickou leukémií, mnohočetným myelomem nebo Juvenilní chronickou myeloidní leukémií (Hoffman, 2012; Bishop, 2009).

Hlavním cílem této léčby je odstranění poškozeného hematopoetického či imunitního systému pacienta a jeho nahrazení zdravými hematopoetickými buňkami od dárce (Hoffman, 2012).

### **5.2.1 Autologní transplantace hematopoetických kmenových buněk**

U autologní HSCT jsou pacientovi transplantovány jeho vlastní krvetvorné kmenové buňky. Nejprve se pacientovi odebere část krvetvorné tkáně, následně je pacient vystaven vysokým dávkám chemoterapie, většinou v kombinaci s ozařováním. Po chemoterapii a ozařování jsou pacientovi transplantovány jeho vlastní, dříve odebrané hematopoetické kmenové buňky a dochází k obnově krvetvorby. Autologní transplantace se využívá především u pacientů s lymfomy a myelomy. K autologní HSCT se využívají tzv. mobilizované krvetvorné kmenové buňky (PBSC - peripheral blood stem cells), tedy buňky imunofenotypu CD33+.

Výhodou autologní transplantace je absence možnosti reakce štěpu proti hostiteli. Tato léčba rovněž často umožňuje zvýšit dávku chemoterapie a zároveň lze využít i starších pacientů, u kterých je pozorován výrazný nárůst mortality v důsledku GVHD jako hlavní komplikace u alogenní HSCT. Hlavní nevýhodou je možnost přítomnosti maligních buněk v transplantovaných krvetvorných buňkách (Hoffman, 2012; Penka, 2011; Kořístek, 2010; Neiderhuber, 2013).

### 5.2.2 Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk

Další možností je alogenní transplantace, tedy transplantace hematopoetických buněk jiného jedince. U alogenní transplantace je materiálem kostní dřev či kmenové buňky odebrané z periferní krve. Vhodný dárcce hematopoetických kmenových buněk je vybírán na základě histokompatibility dárce a příjemce. Základním požadavkem k zabránění aloreaktivity musí být shoda mezi dárce a příjemcem v HLA systému (human leukocyte antigens) (Hoffman, 2012; Penka, 2011; Slezáková, 2010).

Pro transplantaci hematopoetických kmenových buněk je důležitá genotypizace tzv. transplantačních lokusů HLA I. a II. třídy – HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPB1. HLA I. třídy slouží jako ligandy pro TCR na CD8+ T-buňkách, HLA II. třídy jsou ligandy pro TCR na CD4+ buňkách (Beksaç, 2007; Hoffman, 2012; Penka, 2011).

Výhodami alogenní HSCT je obecně nízká pravděpodobnost relapsu onemocnění a graf versus leukemie efekt. Naopak z nevýhod můžeme jmenovat: limitní kompatibilitu dárce (u sourozenců je shoda v průměru ve 25 – 30 % případů), reakce štěpu proti hostiteli (GVHD – graft versus host disease), možnost přenosu virové infekce (cytomegaloviry, adenoviry a podobně) (Lanzkowsky, 2005).

### 5.2.3 Reakce štěpu proti leukémii (GVL – graft versus leukaemia), reakce štěpu proti hostiteli (GVHD - graft versus host disease)

Tato podkapitola je věnována možné negativní reakci buněk dárce po transplantaci HSCT, tedy reakci štěpu proti hostiteli. A také možné pozitivní reakci buněk dárce po transplantaci HSCT, tedy reakci štěpu proti leukémii.

#### 5.2.3.1 GVHD – graft versus host disease

Při transplantaci hematopoetických kmenových buněk musí být transplantované buňky či tkáň imunologicky shodná s buňkami příjemce. U příjemce nesmí docházet k expresi tkáňových antigenů, které jsou přítomné na transplantovaných buňkách. I přes tato opatření může dojít k reakci štěpu proti hostiteli (GVHD). GVHD je rozděleno do dvou skupin: akutní GVHD a chronické GVHD (Hoffman, 2012).

Chronická reakce štěpu proti hostiteli (cGVHD) je nejčastější příčinou morbidity a mortality po transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Zároveň je cGVHD nejčastější dlouhodobě přetrvávající komplikací po alogenní hematopoetické transplantaci kmenových buněk. GVHD způsobuje vážné fyzické, funkční a psychosociální deficity a snižuje kvalitu života pacienta. Z klinického hlediska jde o pleiotropní, multiorgánový

syndrom, kdy dochází k zánětu a fibróze tkáně a často vede k permanentní dysfunkci orgánu (Lee, 2017).

Akutní GVHD přechází do chronické GVHD, a to ve chvíli, kdy díky poškození brzlíku dojde k negativní selekci T-buněk, k deficitu regulace T-buněk, k produkci autoprotilátek abnormálních B-buněk a formování fibrózních lézí (Cotliar, 2016).

K rozvoji akutní GVHD dochází díky antigen prezentujícím buňkám příjemce a T-lymfocytům dárce. Antigen prezentující buňky APC příjemce pohltnou a rozštěpí antigen příjemci vlastní. Fragmenty antigenu vytvoří komplex s MHC molekulou. Tento komplex je předložen T-lymfocytům pocházejících od dárce. Komplex společně s mezibuněčnými membránovými a cytokiny zprostředkovanými interakcemi aktivuje T-lymfocyty od dárce. Aktivované T-lymfocyty dárce začnou napadat buňky příjemce a dojde k uvolňování zánětlivých cytokinů a tím poškození tkání.

#### 5.2.3.2 GVL – reakce štěpu proti leukémii

Při GVHD dochází k vyhledávání a zničení antigenů příjemce buňkami dárce, což vede k poškození zdravých tkání příjemce. GVHD má negativní vliv na příjemce, naopak GVL je pro pacienta velmi prospěšná. Při reakci štěpu proti leukémii (GVL – graft versus leukaemia) buňky dárce napadají zbývající maligní buňky příjemce (Cotliar, 2016).

Aby se u pacientů, nejčastěji s relapsem onemocnění, vyvolala reakce štěpu proti leukémii, připravují se alogenní přípravky pro adoptivní imunoterapii. Pacientovi se podává infuzní přípravek obsahující vysokou koncentraci mononukleárních buněk (lymfocytů a monocytů). DLI (donor lymphocyte infusion) se získávají od zdravého dárce, který daroval hematopoetické kmenové buňky příjemci (Řeháček, 2013; Cotliar, 2016).

### 5.3 Inhibitory signálních drah buňky

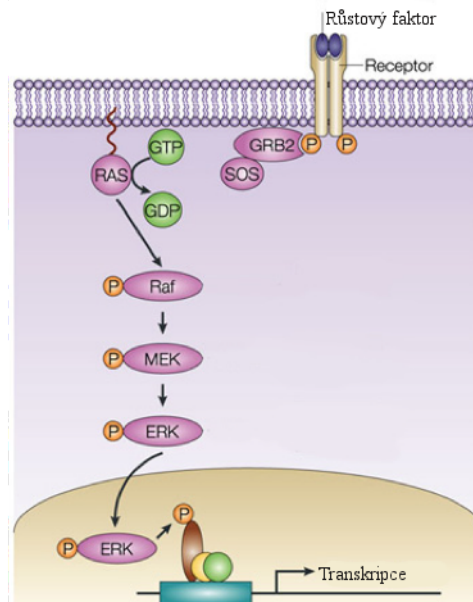
Další možností léčby je inhibice molekul zapojených do některé ze signálních drah, které mají vliv na proliferaci, diferenciaci, schopnost přežití či apoptózu maligní buňky. V následujících podkapitolách budou stručně popsány signální dráhy MAPK, PI3K/AKT a JAK/STAT a možnost jejich inhibice prostřednictvím tyrozin kináz a specifických proteinů (Kurzrock, 2008).

#### 5.3.2 Inhibice signální dráhy MAPK (mitogen-activated protein kinase)

Dráha MAPK zprostředkuje přenos signálů z extracelulárního prostoru do jádra buňky, kde dochází ke spuštění transkripce specifických genů pro proliferaci a diferenciaci

buňky. Abnormality v molekulách signální dráhy vedou ke vzniku maligních buněk (Molina, 2006).

Signální dráha MAPK je uvedena na obrázku 11. Jedná se o kaskádu vzájemných reakcí, jejíž součástí je vazba a aktivace membránového proteinu RAS (Klener 2010, Hoffman 2012, Ward 2012, Molina 2006).



Obrázek 11: Signální kaskáda MAPK

Signální kaskáda MAPK začíná vazbou růstového faktoru na membránový receptor. Vazba postupnou aktivaci signálních molekul a nakonec transkripčních faktorů. Výsledkem je proliferace buňky.

Abnormality v RAS proteinu hrají důležitou roli v patogenezi akutní myeloidní leukémie (AML). Za fyziologických podmínek je RAS protein inaktivován proteiny GAP (GTP-activating proteins), které urychlují hydrolyzu GTP na GDP. Ovšem mutovaný RAS protein je neustále aktivován vazbou GTP a neodpovídá na signály GAP proteinu. Výsledkem je nekontrolovaná, zvýšená proliferace buněk a rozvoj AML.

K inhibici RAS proteinů se využívají látky, které inaktivují fenylyltrasferázu. Ta je důležitá pro translační modifikaci RAS proteinu, a to prenylaci. Při té dochází k připojení izoprenylového lipidového řetězce k C-konci proteinu, což umožňuje vazbu RAS proteinu na intracelulární stranu buněčné membrány. Inhibitor tedy zamezuje vazbě RAS proteinu k membráně, a tudíž způsobuje přerušení signální dráhy MAPK a buňka se dále nemůže dělit.

RAS protein je významný i pro další signální dráhu, která je popsána v následující podkapitole (Hoffman, 2013 Klener, 2010; Gibs, 1994).

### 5.3.3 Inhibice signální dráhy PI3K/AKT (phosphatidyl-3-inositol-kinase/protein kinase B)

Signální dráha PI3K/AKT, která ovlivňuje buněčnou proliferaci a apoptózu, je schematicky znázorněna na obrázku 12. Kaskáda PI3K může být aktivována několika způsoby. Buď dojde k vazbě růstového faktoru na extracelulární doménu tyrozin kinázového receptoru, což vede k jeho dimerizaci a vzniku vazebného místa na intracelulární doméně receptoru. Na vzniklé místo se přímo může vázat PI3K a nebo protein, na který se následně váže PI3K (Brown, 2013; Orkin, 2014).

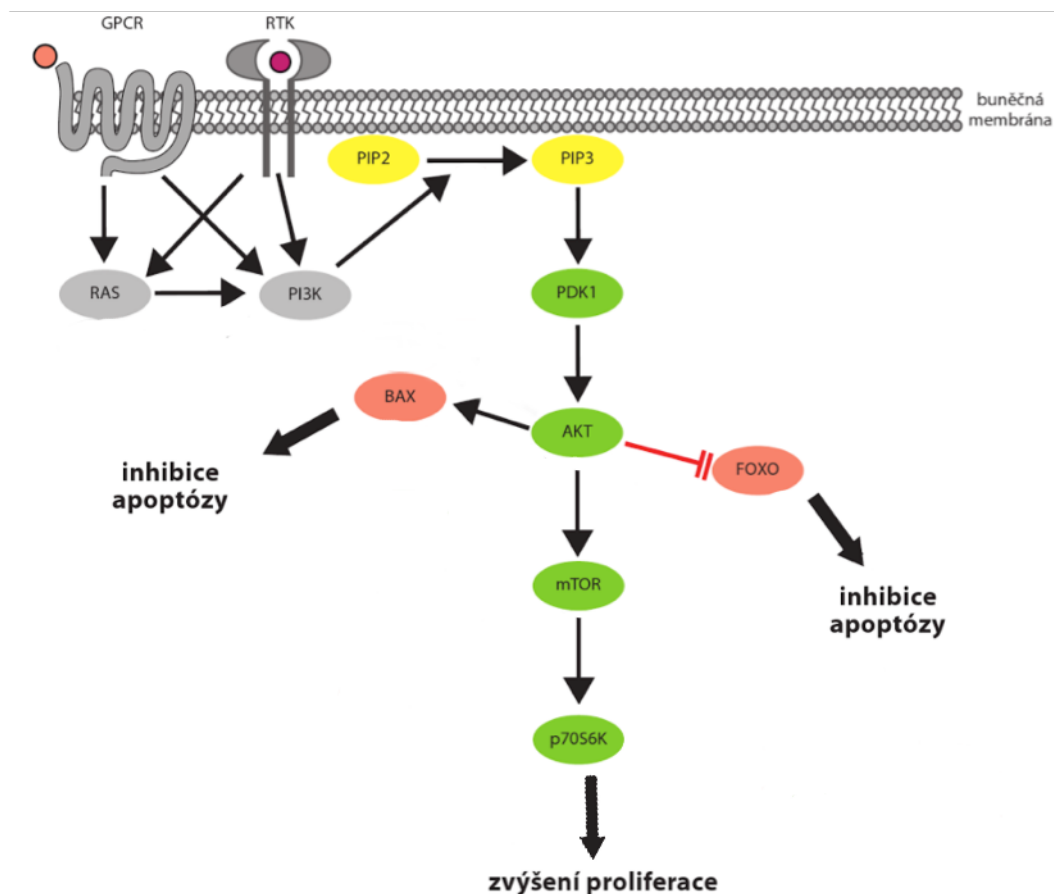
Další možností aktivace signální dráhy je prostřednictvím membránového proteinu RAS. Na RAS protein se naváže GTP, což vede k jeho aktivaci a vzniku vazebného místa pro PI3K a jeho aktivaci (Klener, 2010; Orkin, 2014).

Aktivovaná PI3K migruje k buněčné membráně, jejíž součástí je PIP2 (phosphatidil-inositol-4, 5-bis-phosphate). PI3K katalyzuje fosforylaci PIP2 na PIP3 (phosphatidil-inositol-3, 4, 5,-tris-phosphate), tedy umožňuje vznik druhého posla. Teto druhý posel následně aktivuje PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1), což vede k aktivaci protoonkogenu – protein kinázy B (AKT) (Chabner, 2011).

AKT se může vázat na BAX (B-cell Lymphoma-associated X protein). BAX protein se nachází v cytosolu buňky a po aktivaci způsobuje perforaci mitochondriální membrány, což vede k apoptóze buňky. Pokud dojde k navázání AKT na BAX, dochází k jeho inhibici a tudíž je buňka chráněna proti apoptóze (Hoffma, 2003).

Dále může dojít k vazbě AKT na RHEB (RAS homolog enriched in brain) protein, který následně aktivuje mTOR (serin/threonin proteinkináza). Výsledkem je interakce mTOR s proteinem S6 kinázou (S6K) a její aktivaci. S6K se váže na velkou podjednotku, kde aktivuje translaci mRNA a tedy proteosyntézu (Hoffman, 2003).

AKT se také může vázat na FOXO (forkhead box O). FOXO je transkripční faktor, který po aktivaci a migraci do buněčného jádra spouští transkripci proapoptických genů. Pokud ovšem dojde k navázání AKT na FOXO, je buňka chráněna proti apoptóze, jelikož funkce transkripčního faktoru je inhibována (Hoffman, 2003).



Obrázek 12: Signální kaskáda PI3K/AKT

Aktivace kaskády prostřednictvím RAS proteinu a vazbou růstového faktoru na tyrosin kinázový protein, může mít za následek zvýšenou proliferaci či inhibici apoptózy buňky.

Příčinou patologické aktivace PI3K může být například delece PTEN (Phosphatase and tensin homolog) mutace PI3K či amplifikace AKT (Klener, 2010; Orkin, 2014).

U chronické lymfatické leukémie (CLL) se vyskytuje izoforma PI3K, která je nezbytná pro přenos signálů z membránových buněčných receptorů, ovlivňujících proliferaci a přežití maligních buněk. K aktivaci PI3K je nutné navázání vysokoenergetické molekuly ATP. K léčbě CLL lze využít selektivní inhibitor pro izoformu PI3K, který se naváže na vazebné místo pro ATP. Výsledkem vazby inhibitoru na PI3K je inaktivace této kinázy. To vede k inhibici proliferace a indukci apoptózy maligní buňky, jelikož nedochází k inaktivaci FOXO a BAX (Hoellenriegel, 2011; Hoffma, 2003; Tridente, 2017).

U akutní myeloidní leukémie (AML) dochází k nadměrné expresi PDK1, která společně s PIP3 aktivuje AKT, čímž zvyšuje proliferaci maligních buněk a odolnost proti apoptóze. PDK1 se skládá z katalytické domény a PH domény. PH doména slouží k vazbě PIP3 druhého posla, na katalytické doméně se nachází vazebné místo pro ATP. K tomu aby

došlo k aktivaci PDK1 je nutné také navázání ATP. K léčbě AML se využívá selektivní inhibitor pro PDK1, který se váže na vazebné místo pro ATP v katalytické doméně. Výsledkem vazby je inaktivace PDK1, následkem toho dochází k inhibici proliferace a indukce apoptózy maligní buňky, protože opět nedochází k aktivaci AKT (Scheid, 2005; Zabkiewicz, 2010; Chabner, 2011).

Dalším cílem pro inhibici signální dráhy PI3K/AKT v maligních buňkách je protein kináza B. Inhibitory pro AKT jsou navrženy tak, aby došlo k jejich vazbě na APT vazebné místo v kinázové doméně, PH doméně nebo kompetitivní vazbě na místo regulačních faktorů. Inhibitory AKT se využívají u relapsů lymfoproliferativních onemocnění (Klener, 2013; Chairini, 2008; Litzow, 2015).

Jeden z nejvýznamnějších inhibitorů kaskády PI3K/AKT je cílený proti mTOR proteinu. Inhibitor vytváří komplexy s malým proteinem a následně se ireverzibilně váže na mTOR protein. Výsledkem vazby je inhibice fosforylace S6K, která je zprostředkována právě mTOR proteinem. Nemůže tedy docházet k aktivaci transkripce genů pro proliferaci maligní buňky. Inhibitory mTOR se využívají k léčbě lymfomu z plášťových buněk, myelodysplastického syndromu či AML (Kelner, 2010; Chabner, 2011; Hoffman, 2013; Chabner 2011).

#### 5.3.4 Inhibice signální dráhy JAK (Janusova kináza)/STAT (signal transducer and activator of transcription)

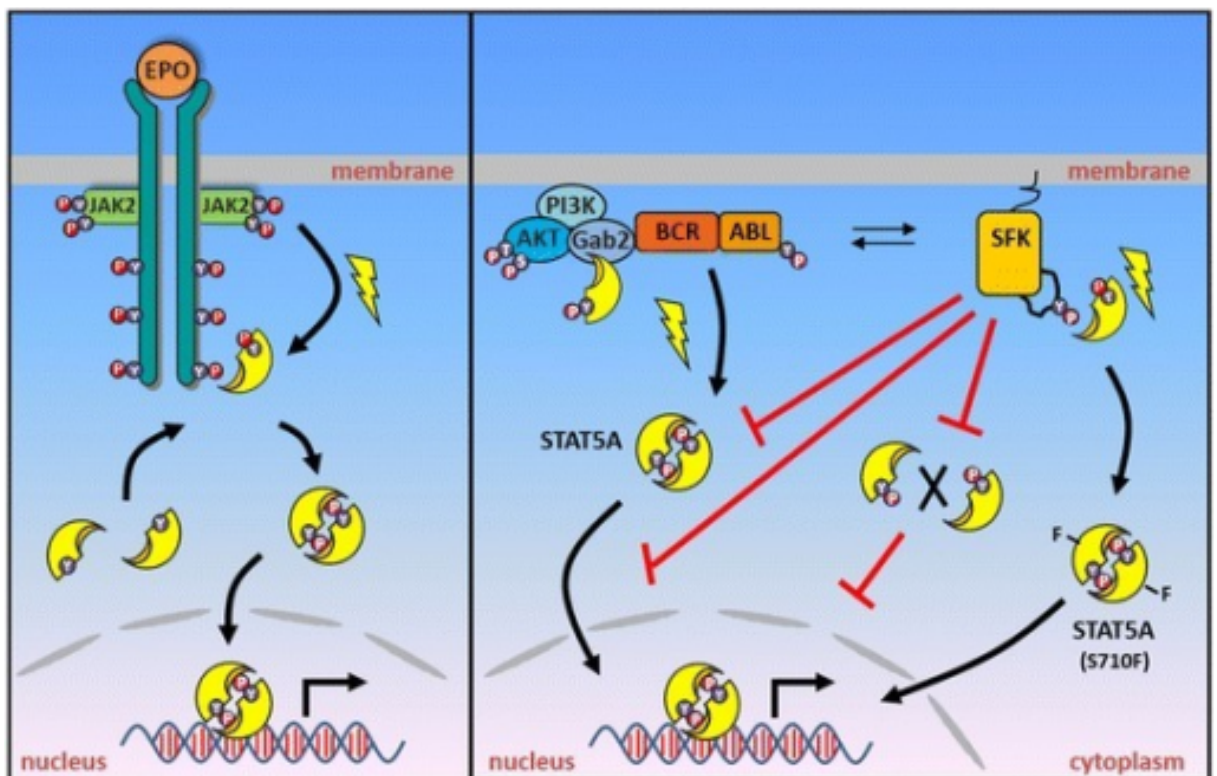
JAK-STAT kaskáda je jednou z hlavních signalizačních drah cytokinů. Aktivace začíná po vazbě cytokinů na receptorové tyrozin kinázy. Dochází k asociaci receptorů a aktivaci JAK, která je vázána na intracelulární doménu receptoru. JAK2 katalyzuje fosforylaci intracelulární domény receptorů a tím vznikají dvě vazebná místa pro STAT. Výsledkem reakce je oddělení proteinů od receptoru a vznik STAT dimeru. Dimery se spojí a migrují do jádra, kde se vážou na promotorovou oblast DNA a spouštějí transkripci genů.

U pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) s pozitivním Filadelfským chromozomem dochází k aktivaci STAT i prostřednictvím fúzního proteinu bcr/abl (break cluster region/Abelson tyrosine kinase). CML vzniká především v důsledku translokace genu ABL z 9. chromozomu na 22. chromozom. Výsledkem translokace je fúzní gen BCR/ABL, který kóduje fúzní protein bcr/abl. U zdravého jedince ABL gen kóduje tyrozinkinázu, aktivující buněčnou proliferaci. U CML fúzní gen kóduje fúzní protein bcr/abl, který má tyrozin kinázovou aktivitu, ale neodpovídá na zpětnou vazbu, a tudíž dochází k nekontrolovatelné proliferaci buněk. Protein bcr/abl je neustále aktivován vazbou ATP, což



vede k fosforylaci STAT (signal transducer and activator of transcription). Aktivací STAT dochází k akumulaci transkripčních faktorů v buněčném jádru (obrázek 13). Výsledkem je nekontrolovatelná proliferace myeloidních buněk.

K léčbě CML lze tedy využít inhibitor pro fúzní protein. Inhibitor se váže na nukleotidové vazebné místo fúzního proteinu, takže zde není možná vazba ATP a protein zůstává v neaktivní formě. Protein neaktivuje STAT a dochází k inhibici proliferace buňky a její apoptózy (Adam, 2008; Rokyta, 2015; Hoffman, 2012; Schellens, 2005; Klener, 2010).



Obrázek 13: Signalizace u zdravé buňky a myeloidní buňky

Na pravé straně je signalizace u zdravé buňky řízena EPO (erythropoetinem). Vazba EPO na receptor aktivuje JAK2 (Janusova kinázy 2), což vede k aktivaci STAT.

Na levé straně dochází k aktivaci STAT prostřednictvím fúzního proteinu bcr/abl. Zároveň bcr/abl stimuluje nereceptorovou tyrozin kinázu SFK.

Dalším onemocněním, u něhož hraje roli poškození signální dráhy JAK/STAT, je mnohočetný myelom. Pro jeho patogenezi má velký význam interleukin 6 (IL6), který ovlivňuje přežití maligních buněk. Interleukin 6 je protizánětlivý cytokin, který vazbou na membránový receptor aktivuje kaskádu JAK/STAT. Po navázání IL-6 na receptor dochází k aktivaci transkripční funkce STAT, což může vést k diferenciaci B-buněk do maligních

plazmatických buněk. Pokud dojde k rozvoji mnohočetného myelomu, pak díky IL6 signalizaci dochází k produkci velkého množství antiapoptických proteinů a maligní buňky jsou tak chráněny proti apoptóze. K léčbě mnohočetného myelomu lze využít ligand, který zabráni vazbě IL-6 na membránový receptor, což inhibuje kaskádu JAK/STAT. Díky inaktivaci kaskády nedochází k tvorbě antiapoptických proteinů. Maligní buňka přestává být chráněna proti apoptóze a zaniká (Savino, 1997; Chatterjee, 2004; Karel, 2014).

Janusova kináza patří mezi cytoplazmatické tyrosin kinázy a má tři izomorfy: JAK1, JAK2 a JAK3. Při mutaci v JAK2 genu, kdy nejčastější bývá JAK2 V617F, dochází k patologickým procesům, vedoucím k rozvoji myeloproliferativních onemocnění – polycytémie vera, esenciální trombocytémie a další (Hoffman, 2012). Pro inhibici JAK kinázy se využívá kinázový ATP-kompetitivní inhibitor. Inhibitor se váže na kinázovou doménu JAK a zabraňuje vazbě vysokoenergetické ATP molekuly. Nedochází k aktivaci kinázy a tudíž ani k signalizaci pro proliferaci maligní buňky (Mascarenhas, 2012).

## 6 ZÁVĚR

Díky dynamickému rozvoji laboratorních metod a novým vědním podoborům jako je proteomika dochází k lepšímu chápání patofyziologie hematologických malignit.

Rozvoj molekulární genetiky významně přispěl nejen k podrobnější klasifikaci, ale především k diagnostice hematologických malignit. Právě diagnostické techniky molekulární genetiky povedou ke stále dokonalejšímu klasifikačnímu systému a přesnější, případně i rychlejší diagnostice hematologických malignit.

K velkému pokroku došlo i v oblasti terapie. V dnešní době se odstupuje od transplantace kostní dřeně a naopak se přistupuje k mnohem modernější a pro dárce méně zatěžující transplantaci krvetvorných kmenových buněk či autologní transplantaci hematopoetických kmenových buněk, kdy nehrozí k rozvoji GVHD.

Velký rozvoj je zaznamenán i v imunoterapii a terapii pomocí specifických inhibitorů. Byly objeveny nové léky, které cíleně ovlivňují metabolismus a proliferaci maligních buněk. Došlo k objevům inhibitorů a imunokonjugátů, které lze použít u pacientů s rozvojem rezistence na běžně používané léky.

Přestože v současné době je značná část hematologických malignit léčitelná, stále ročně umírá tisíce lidí v důsledku rozvoje patologické hematopoézy. Avšak díky stálému objevu nových cílených léčebných postupů a zlepšující se diagnostice, lze doufat, že počet vyléčených osob, trpících některým typem hematologické malignity, bude v budoucnu narůstat a naopak se sníží počet úmrtí v důsledku hematologických malignit.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA:

ABDUL-HAMID, Gamal. Classification of Acute Leukemia. *Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge* [online]. InTech, 2011 [cit. 2016-07-03]. DOI: 10.5772/19848. ISBN 978-953-307-553-2. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/acute-leukemia-the-scientist-s-perspective-and-challenge/classification-of-acute-leukemia>

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) incidence statistics Cancer Research UK. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/leukaemia-all/incidence>

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 9788024725024. ADVANI, Ranjana H., et al.

ADVANI, Ranjana H., Joseph J. BUGGY, Jeff P. SHARMAN, et al. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2013, 31(1), 88-94 [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.7906. ISSN 0732-183x. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2012.42.7906> BAIN, Barbara J. *Blood cells: a practical guide*. John Wiley & Sons, 2014.

ALVIN H. SCHMAIER a LILLI M. PETRUZZELLI. *Hematology for the medical student*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. ISBN 9780781731201.

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Výšetrovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

BEKSAC, Meral. *Bone marrow and stem cell transplantation*. Second edition. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 1109. ISBN 978-1-4614-9437-9.

BENEKLI, M., M. R. BAER, H. BAUMANN a M. WETZLER. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* [online]. 2003, 101(8), 2940-2954 [cit. 2016-02-17]. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1204. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-04-1204>

BENNETT, J. M. Assessment of treatment-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in patients with non-Hodgkin lymphoma treated with tositumomab and iodine I131 tositumomab. *Blood* [online]. 2005, 105(12), 4576-4582 [cit. 2017-01-28]. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4690. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-12-4690>

BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetiky pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 9788024632247.

BROWN, Jennifer R. *Chronic Lymphocytic Leukemia, An Issue of Hematology/Oncology Clinics of North America*. London: Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN: 978-14557-7188-2

BROWN, Michael; WITTEWER, Carl. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry* [online] 2000, 46.8: 1221-1229. [cit. 2016-04-28] Dostupné z: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/46/8/1221.full.pdf>

BROWN, T. A. *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. Seventh edition. John Wiley & Sons, 2015. . ISBN 9781119072577

CELLULAIRE, Bioénergétique, et al. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2002, 2: 3-10. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z:

[http://arquivo.ufv.br/DBV/PGFVG/BVE684/htms/pdfs\\_revisao/genomica/protome\\_articles/RabilloudProteomicsReview2002.pdf](http://arquivo.ufv.br/DBV/PGFVG/BVE684/htms/pdfs_revisao/genomica/protome_articles/RabilloudProteomicsReview2002.pdf)

ČERMÁK, J. Myelodysplastický syndrom–novinky v diagnostice a léčbě. *zdravi.euro.cz - Zdravotnictví a medicína Postgraduální medicína*, 2010, 6: 712-719. [cit. 2016-12-26]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/myelodysplasticky-syndrom-novinky-v-diagnostice-a-lecbe-452340>

CETKOVSKÝ , MUDr Petr. Akutní myeloidní leukémie. *zdravi.euro.cz - Zdravotnictví a medicína Postgraduální medicína*, 2007, 3: 263-271. [cit. 2016-08-26]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/akutni-myeloidni-leukemie-295145>

CETKOVSKÝ, MUDr Petr. Akutní lymfoblastická leukémie dospělých. *zdravi.euro.cz - Zdravotnictví a medicína Postgraduální medicína* 2000, 2: 194-199 [cit. 2016-08-26]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/akutni-myeloidni-leukemie-295145>

CHABNER, Bruce. a Dan L. LONGO. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2011. ISBN 978-1-60547-431-1.

CHABNER, Bruce. a Dan L. LONGO. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2011. ISBN 978-1-60547-431-1.

CHAN, John K. C. The new World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. *Hematological Oncology* [online]. 2001, 19(4), 129-150 [cit.

2016-05-27]. DOI: 10.1002/hon.660. ISSN 0278-0232. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hon.660>

CHATTERJEE, M. Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. *Blood* [online]. 2004, 104(12), 3712-3721 [cit. 2017-05-30]. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1670. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-04-1670>.

CHEN, Bing-Yuan; JANES, Harry W. (ed.). *PCR cloning protocols*. 2. ed. Totowa, N.J.: Humana Press, 2002. ISBN 9780896039698.

CHIARINI, F, M DEL SOLE, S MONGIORGI, et al. The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia* [online]. 2008, 22(6), 1106-1116 [cit. 2017-06-20]. DOI: 10.1038/leu.2008.79. ISSN 0887-6924. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2008.79>

CIBULA, David a Luboš PETRUŽELKA. *Onkogynekologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2665-6.

CILLONI, D., et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Nature Research: science journals, jobs, information and services*. [cit. 2016-06-23].

doi:10.1038/leu.2009.51. ISSN: 0887-6924 Dostupné z:

<http://www.nature.com/leu/journal/v16/n10/full/2402675a.html>

COTLIAR, Jonathan A. (ed.). *Atlas of Graft-versus-Host Disease: Approaches to Diagnosis and Treatment*. Cham: Springer, 2016. ISBN: 978-3-319-46952-2

CRISTEA, I. M. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* [online]. 2004, 103(10), 3624-3634 [cit. 2016-09-30]. DOI: 10.1182/blood-2003-09-3295. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-09-3295>

ČS CLL: Česká skupina pro chronickou lymfocytární leukémi, [cit-2016-05-17] Dostupné z: <http://www.cll.cz>

CWIERTKA, Karel, et al. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klinická Farmakol Farm* [online] 2004, 18: 165-170. [cit. 2018-03-30]. Dostupné z: [https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-200403-0009\\_Terapeuticke\\_monoklonalni\\_protilatky\\_v\\_onkologii.php](https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-200403-0009_Terapeuticke_monoklonalni_protilatky_v_onkologii.php)

DĄBEK, Józefa, Andrzej KUŁACH a Zbigniew GAŚSIOR. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB): a new potential therapeutic target in atherosclerosis?

*Pharmacological Reports* [online]. 2010, 62(5), 778-783 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/S1734-1140(10)70338-8. ISSN 17341140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1734114010703388>

DAHLE, J., J. BORREBAEK, T. J. JONASDOTTIR, A. K. HJELMERUD, K. B. MELHUS, O. S. BRULAND, O. W. PRESS a R. H. LARSEN. Targeted cancer therapy with a novel low-dose rate  $\alpha$ -emitting radioimmunoconjugate. *Blood* [online]. 2007, 110(6), 2049-2056 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1182/blood-2007-01-066803. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-01-066803>

DÜBEL, Stefan; REICHERT, Janic M. (ed.). *Handbook of therapeutic antibodies*. Second edition John Wiley & Sons, 2014

ERBER, Wendy N. (ed.). *Diagnostic techniques in hematological malignancies*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. ISBN: 978-05-117-6027-3.

ERICKSON, P., et al. Identification of breakpoints in t (8; 21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood* [online], 1992, 80.7: 1825-1831. [cit. 2016-04-07]. ISSN 0006-4971 Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/80/7/1825.full.pdf>

EUCAN | Home page. *NEW European Cancer Observatory* [online]. Copyright © IARC 2012 [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://eco.iarc.fr/eucan/Default.aspx>

FIGGITT, David P., Harriet M. LAMB a Karen L. GOA. Denileukin Diftitox. *American Journal of Clinical Dermatology* [online]. 2000, 1(1), 67-72 [cit. 2016-12-20]. DOI: 10.2165/00128071-200001010-00008. ISSN 1175-0561. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00128071-200001010-00008>

FINN, William G. a LoAnn C. PETERSON. *Hematopathology in oncology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, c2004. ISBN 978-1-4020-7920-7.

FITZGERALD, D. J., A. S. WAYNE, R. J. KREITMAN a I. PASTAN. Treatment of Hematologic Malignancies with Immunotoxins and Antibody-Drug Conjugates. *Cancer Research* [online]. 2011, 71(20), 6300-6309 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1374. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-1374>

FOLBER, František; DOUBEK, Michael. Novinky v léčbě akutní lymfoblastické leukemie dospělých. *Onkologie*, 2013, 7.3: 113-116. [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2013/03/03.pdf>

FOSS, F. A phase-1 trial of bexarotene and denileukin diftitox in patients with relapsed or refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* [online]. 2005, 106(2), 454-457 [cit. 2016-04-

25]. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4570. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-11-4570>

FRANCISCO, J. A. CAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* [online]. 2003, 102(4), 1458-1465 [cit. 2017-04-29]. DOI: 10.1182/blood-2003-01-0039. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-01-0039>

FRANKEL, Arthur E., David M. NEVILLE, Thomas A. BUGGE, Robert J. KREITMAN a Stephen H. LEPLA. Immunotoxin therapy of hematologic malignancies. *Seminars in Oncology* [online]. 2003, 30(4), 545-557 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1016/S0093-7754(03)00241-0. ISSN 00937754. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093775403002410>

GARCÍA-GUTIÉRREZ, Valentín, et al. Safety and Efficacy of Bosutinib in Fourth Line Therapy of Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Blood*, 2015, 126.23: 2786-2786. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/2786>

GAZDOVÁ, Jana, et al. Úloha FLT3 mutací v patogenezi akutní myeloidní leukemie. *Transfúze Hematol dnes*, [online]. 2009, 229-236. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/transfuzehematologie-dnes-clanek/uloha-flt3-mutaci-v-patogenezi-akutni-myeloidni-leukemie-30908>

GIBBS, Jackson B., Allen OLIFF a Nancy E. KOHL. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell* [online]. 1994, 77(2), 175-178 [cit. 2017-06-06]. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90308-5. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867494903085>

*GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide in 2012*. IARC, 2014. [cit. 2016-05-10] Dostupné z: <http://www.iarc.fr>

GOLDBERG, L., M. R. TIJSEN, Y. BIRGER, et al. Genome-scale expression and transcription factor binding profiles reveal therapeutic targets in transgenic ERG myeloid leukemia. *Blood* [online]. 2013, 122(15), 2694-2703 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1182/blood-2013-01-477133. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-01-477133>

GRAWUNDER, Ulf; BARTH, Stefan (ed.). *Next Generation Antibody Drug Conjugates (ADCs) and Immunotoxins*. Cham : Springer 2017. ISBN: 978-3-319-46875-4

GRIBBEN, John, PROVAN, Andrew, ed. *Molecular hematology*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-1-4051-8231-7. PUI, Ching-Hon; EVANS, William E. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 1998, 339.9: 605-615.



HARRIS, N. L., et al. Lymphoma classification—from controversy to consensus: the REAL and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Annals of oncology*. 2000. [online] 11.suppl 1: S3-S10. 457 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1093/annonc/11.suppl\_1.s3 Dostupné z: [https://academic.oup.com/annonc/article/11/suppl\\_1/S3/175597/Lymphoma-classification-from-controversy-to?searchresult=1](https://academic.oup.com/annonc/article/11/suppl_1/S3/175597/Lymphoma-classification-from-controversy-to?searchresult=1)

HARRIS, N. Lee, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, [online] 1994, 84.5: 1361. [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/84/5/1361>

HARRIS, Nancy Lee, et al. The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the clinical advisory committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Modern Pathology Nature Research: science journals, jobs, information and services*. [online]. 2000. 13.2: 193-207. [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: <https://www.nature.com/modpathol/journal/v13/n2/full/3880035a.html>

HARRISON, Claire, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *New England Journal of Medicine*, 2012, 366.9: 787-798. [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1056/NEJMoa1110556. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1110556#t=article>

HAVLIŠ, Jan. Hmotnostní spektrometrie MALDI ToF. *Vesmír*, 1999, 8, 445-448

HERMAN, S. E. M., A. L. GORDON, E. HERTLEIN, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* [online]. 2011, 117(23), 6287-6296 [cit. 2017-06-03]. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328484. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-01-328484>

HO, Phoenix A., Todd A. ALONZO, Robert B. GERBING, et al. High EVI1 expression is associated with MLL rearrangements and predicts decreased survival in paediatric acute myeloid leukaemia: a report from the children's oncology group. *British Journal of Haematology* [online]. 2013, 162(5), 670-677 [cit. 2016-07-29]. DOI: 10.1111/bjh.12444. ISSN 00071048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.12444>

HOELLENRIEGEL, J., S. A. MEADOWS, M. SIVINA, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* [online]. 2011, 118(13), 3603-3612 [cit. 2017-06-24]. DOI: 10.1182/blood-2011-05-352492. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-05-352492>

HOFFMAN, Ronald, ed. *Hematology: basic principles and practice*. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, c2013. ISBN 978-1-4377-2928-3.

HOFFMAN, Ronald, et al. *Hematology: Diagnosis and Treatment*. 6th ed. London: Elsevier Health Sciences, 2013. ISBN: 978-1-4557-7688-7

[https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/11.suppl\\_1.S3](https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/11.suppl_1.S3)

ISSAQ, Haleem J., Timothy D. VEENSTRA, Thomas P. CONRADS a Donna FELSCHOW. The SELDI-TOF MS Approach to Proteomics: Protein Profiling and Biomarker Identification. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2002, 292(3), 587-592 [cit. 2016-07-08]. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6678. ISSN 0006291x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X02966787>

JABBOUR, Elias a Hagop KANTARJIAN. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *American Journal of Hematology* [online]. 2014, 89(5), 547-556 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1002/ajh.23691. ISSN 03618609. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.23691>

JAROŠOVÁ, Marie, et al. Cytogenetika a molekulární cytogenetika v diagnostice a stanovení prognózy myeloproliferativních neoplázií. *Onkologie*, 2012, 6.3: 152-158. [cit. 2016-04-25] Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2012/03/06.pdf>

JENNINGS, C. Darrell; FOON, Kenneth A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*, [online] 1997, 90.8: 2863-2892. [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/90/8/2863?sso-checked=true>

JOVANOVIC, J. V., J. SCORE, K. WAGHORN, et al. Low-dose imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in FIP1L1-PDGFRα positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* [online]. 2007, 109(11), 4635-4640 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1182/blood-2006-10-050054. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2006-10-050054>.

KAČÍRKOVÁ, Petra a Vít CAMPR. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1853-8.

KAPURIA, Vaibhav, et al. Inhibition of JAK2/STAT Signaling by Degrasyn through a Novel Mechanism. *Blood*, [online]. 2006. 108.11: 3423-3423. [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/108/11/3423>

KAREL, Pavelka, et al. *Biologická léčba zánětlivých autoimunitních onemocnění: v revmatologii, gastroenterologii a dermatologii*. Praha: Grada Publishing as, 2014. ISBN: 978-80-247-5048-4

KHEIRALLAH, S., P. CARON, E. GROSS, A. QUILLET-MARY, J. BERTRAND-

MICHEL, J.-J. FOURNIE, G. LAURENT a C. BEZOMBES. Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. *Blood* [online]. 2010, 115(5), 985-994 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1182/blood-2009-08-237537. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-08-237537>

KLENER, Pavel. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vydání. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.

KOOLMAN Jan, Röhm Klaus-Heinrich. *Barevný atlas biochemie* 4. vydání Grada. 2012. ISBN: 978-80-247-2977-0

KOŘÍSTEK, Zdeněk. Mobilizace kmenových krvetvorných buněk. *Remedia*. 2010. [online] 5/2010. [cit. 2016-05-30]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz>

KRALOVICS, R. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* [online]. 2006, 108(4), 1377-1380 [cit. 2016-07-27]. DOI: 10.1182/blood-2005-11-009605. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2005-11-009605>

KUGLÍK, P.; Vranová, V.; Filková, H. Metody klasické a molekulární cytogenetiky v diagnostice mnohočetného myelomu. *Moderní diagnostické a prognostické nástroje pro mnohobuněčný myelom*. [online]. 2008. 21.1: 198-203 Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/144/3321.pdf>

LANGER, C., M. D. RADMACHER, A. S. RUPPERT, et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood* [online]. 2008, 111(11), 5371-5379 [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1182/blood-2007-11-124958. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-11-124958>

LANNUTTI, B. J., S. A. MEADOWS, S. E. M. HERMAN, et al. CAL-101, a p110 selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* [online]. 2011, 117(2), 591-594 [cit. 2017-06-25]. DOI: 10.1182/blood-2010-03-275305. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-03-275305>

LANZKOWSKY, Philip. *Manual of pediatric hematology and oncology*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2011. ISBN 9780123751553.

LEE, Stephanie J. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood* [online]. 2017, 129(1), 30-37 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1182/blood-2016-07-686642. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood-2016-07-686642>

LITZOW, M. R. a A. A. FERRANDO. How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* [online]. 2015, 126(7), 833-841 [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1182/blood-2014-10-551895. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2014-10-551895>

LIU, L., Y. CAO, C. CHEN, et al. Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. *Cancer Research* [online]. 2006, 66(24), 11851-11858 [cit. 2017-05-31]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-1377>

LUGTHART, S., E. VAN DRUNEN, Y. VAN NORDEN, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* [online]. 2008, 111(8), 4329-4337 [cit. 2016-09-25]. DOI: 10.1182/blood-2007-10-119230. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-10-119230>

MA, Huihui, et al. Cucurbitacin I (JSI-124) Has Potent Anti-Myeloma Effects Independent of Its Inhibition of JAK2-Induced STAT3 Activation. *Blood* [online]. 2007, 110.11: 2521-2521. [cit. 2017-11-31]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/110/11/2521?sso-checked=true>

MALEK, Sami. *Advances in chronic lymphocytic leukemia*. Advances in experimental medicine and biology, 792. New York: Springer. 2013. ISBN 978-1-4614-8050-1.

MARCOS-GRAGERA, R., C. ALLEMANI, C. TEREANU, et al. Survival of European patients diagnosed with lymphoid neoplasms in 2000-2002: results of the HAEMACARE project. *Haematologica* [online]. 2011, 96(5), 720-728 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.3324/haematol.2010.034264. ISSN 0390-6078. Dostupné z: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2010.034264>

MASCARENHAS, J. a R. HOFFMAN. Ruxolitinib: The First FDA Approved Therapy for the Treatment of Myelofibrosis. *Clinical Cancer Research* [online]. 2012, 18(11), 3008-3014 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3145. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-3145>

MATTHEWS, David J.; GERRITSEN, Mary E. *Targeting protein kinases for cancer therapy*. John Wiley & Sons, 2011. ISBN: 978-047055-529-3

MAYER, J., et al. Využití rituximabu v léčbě chronické lymfatické leukemie rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *časopis české onkologické společnosti a slovenskej onkologickej spoločnosti the journal of the czech and slovak oncological societies*, [online]

2003, 16.4: 178. [cit. 2017-02-24]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/41/865.pdf>

MICHAEL R. BISHOP a EDITOR. *Hematopoietic stem cell transplantation*. New York: Springer, 2009. ISBN 9780387785806.

MOLINA, Julian R. a Alex A. ADJEI. The Ras/Raf/MAPK Pathway. *Journal of Thoracic Oncology* [online]. 2006, 1(1), 7-9 [cit. 2017-05-25]. DOI: 10.1016/S1556-0864(15)31506-9. ISSN 15560864. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086415315069>

MONAGHAN, K. A., et al. The novel JAK inhibitor CYT387 suppresses multiple signalling pathways, prevents proliferation and induces apoptosis in phenotypically diverse myeloma cells. *Leukemia*. online. 2011, 25.12: 1891-1899. [cit. 2016-05-09]. doi:10.1038/leu.2011.175. Dostupné z: <https://www.nature.com/leu/journal/v25/n12/abs/leu2011175a.html>

MUFTI, G. J., J. M. BENNETT, J. GOASGUEN, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica* [online]. 2008, 93(11), 1712-1717 [cit. 2016-06-13]. DOI: 10.3324/haematol.13405. ISSN 0390-6078. Dostupné z: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.13405>

MURPHY, Peter B.; CLARKE, Jason R. *Oncogene Proteins: Structure, Functions and Analyses*. Nova Publishers, 2008. ISBN: 978-160456-259-0

Národní informační a vzdělávací portál o onkologických onemocnění dětského věku [cit. 2016-05-15], Dostupné z: <http://detskaonkologie.registry.cz/index.php>

National Cancer institute [cit. 2016-05-10] Dostupné z: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html>

NIEDERHUBER, John E. *Abeloff's clinical oncology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, c2014. ISBN 978-1-4557-2865-7.

O'BRIEN, Susan, Julie M. VOSE a Hagop KANTARJIAN. *Management of hematologic malignancies*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. ISBN 9780521896405.

OKKENHAUG, Klaus; TURNER, Martin; GOLD, Michael R. (ed.). *PI3K signalling*. Frontiers Media SA, 2015. ISBN: 978-2-88919-419-3

ORKIN, Stuart H., David E. FISCHER, David GINSBURG, A. Thomas LOOK, Samuel E. LUX a David G. NATHAN. *Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood*. Eighth edition. Philadelphia: Elsevier, 2015. ISBN 978-1-4557-5414-4.

OTOVÁ, Berta; MIHALOVÁ, Romana. *Základy biologie a genetiky člověka*. Praha: Karolinum Press, 2013. ISBN: 978-80-246-2109-8

PALANCA-WESSELS, M. C. a O. W. PRESS. Advances in the treatment of hematologic malignancies using immunoconjugates. *Blood* [online]. 2014, 123(15), 2293-2301 [cit. 2016-11-23]. DOI: 10.1182/blood-2013-10-492223. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-10-492223>

PANCZAK, Aleš; OTOVÁ, Berta (ed.). *Lékařská biologie a genetika (III. díl)*. Praha: Karolinum Press, 2014.

PAPAJÍK, MUDr Tomáš; INDRÁK, MUDr Karel; ŠKRHOVÁ, MUDr Dagmar. Chronická lymfatická leukémie. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.cls.cz>

PAVLOVA, S.; MAYER, J.; MARDOVÁ, J. NÁDOROVÝ SUPRESOR P53 A LEUKEMIE TUMOR SUPPRESSOR P53 AND LEUKEMIA. *Masarykův onkologický ústav Brno*, 2002, 15.4

PENKA, Miroslav. *Hematologie a transfúzní lékařství*. 1. vydání. Tesařová Eva. Praha: Grada Publishing a.s., 2011. ISBN: 978-80-247-3459-0

PHILLIPS, Gail Lewis (ed.). *Antibody-drug conjugates and immunotoxins: from pre-clinical development to therapeutic applications*. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN: 978-1-4614-5456-4

PONADER, S., S.-S. CHEN, J. J. BUGGY, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* [online]. 2012, 119(5), 1182-1189 [cit. 2017-05-24]. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386417. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-10-386417>

PRICE, Pat; SIKORA, Karol (et.). *Treatment of Cancer Fifth Edition*. CRC Press, 2008, ISBN: 97814444109788

QUINTAS-CARDAMA, A. a J. CORTES. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* [online]. 2009, 113(8), 1619-1630 [cit. 2017-06-12]. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144790. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-03-144790>

RAND, V., H. PARKER, L. J. RUSSELL, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [online]. 2011, 117(25), 6848-6855 [cit. 2016-07-25]. DOI: 10.1182/blood-2011-01-329961. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-01-329961>

REDAELLI, A., B.L. LASKIN, J.M. STEPHENS, M.F. BOTTEMAN a C.L. PASHOS. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic

leukaemia (ALL). *European Journal of Cancer Care* [online]. 2005, 14(1), 53-62 [cit. 2016-06-16]. DOI: 10.1111/j.1365-2354.2005.00513.x. ISSN 0961-5423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2354.2005.00513.x>

REJTHAR, Aleš. *Klinická okologie*. 2004-08-15. s. 121-160. [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: [https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwieyb607-](https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwieyb607-3UAhXHYJoKHaEUdUkQFgghMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.mou.cz%2Fcasopis-klinicka-onkologie-3-2004%2Ff529&usg=AFQjCNFTXGjgO5pkX13CST8cERLThHw2kQ)

[3UAhXHYJoKHaEUdUkQFgghMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.mou.cz%2Fcasopis-](https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwieyb607-3UAhXHYJoKHaEUdUkQFgghMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.mou.cz%2Fcasopis-klinicka-onkologie-3-2004%2Ff529&usg=AFQjCNFTXGjgO5pkX13CST8cERLThHw2kQ)  
[klinicka-onkologie-3-2004%2Ff529&usg=AFQjCNFTXGjgO5pkX13CST8cERLThHw2kQ](https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwieyb607-3UAhXHYJoKHaEUdUkQFgghMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.mou.cz%2Fcasopis-klinicka-onkologie-3-2004%2Ff529&usg=AFQjCNFTXGjgO5pkX13CST8cERLThHw2kQ)

ROONEY, D. E. *Human cytogenetics: malignancy and acquired abnormalities : a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, c2001. Practical approach series. ISBN 0-19-963841-1. ŘEHÁČEK Vít, MASOPUST Jiří a kolektiv. *Transfúzní lékařství*. Praha: Grada Publishing a.s. 2013. ISBN: 978-8-02474-534-3.

SAFDAR, Amar (ed.). *Principles and practice of cancer infectious disease*, Springer, 2011, ISBN 978-1-607-61643-6

ŠÁLEK, Cyril. Diagnostika a léčba akutních leukémií. *Interní medicína pro praxi*. Solen medical education, 2012-07-26, 14(10), s. 366-372 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/10/05.pdf>

SANT, M., C. ALLEMANI, C. TEREANU, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* [online]. 2010, 116(19), 3724-3734 [cit. 2017-07-03]. DOI: 10.1182/blood-2010-05-282632. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-05-282632>

SAVINO, R, A DEMARTIS, L CIAPPONI, et al. The receptor super-antagonist Sant7. *Oncology Reports* [online]. 1997, , - [cit. 2017-06-18]. DOI: 10.3892/or.4.3.485. ISSN 1021-335x. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.4.3.485>

SCHEID, M. P., M. PARSONS a J. R. WOODGETT. Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation of PDK1 Regulates Nuclear Translocation. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2005, 25(6), 2347-2363 [cit. 2017-06-20]. DOI: 10.1128/MCB.25.6.2347-2363.2005. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.25.6.2347-2363.2005>

SCHELLENS, Jan H. M., Howard L. MCLEOD a David R. NEWELL. *Cancer clinical pharmacology*. New York: Oxford University Press, 2005. ISBN 0192629662.

SCHWAB, Manfred, ed. *Encyclopedic reference of cancer*. Berlin: Springer, c2001. ISBN 3-540-66527-7.

SEGEREN, C a M VANTVEER. The FAB classification for acute myeloid leukaemia?is it

outdated? *The Netherlands Journal of Medicine* [online]. 1996, 49(3), 126-131 [cit. 2016-04-23]. DOI: 10.1016/0300-2977(96)00024-1. ISSN 03002977. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300297796000241>

SLEZÁKOVÁ, Lenka; KOL, A. *Ošetrovatelství v chirurgii II.* 1. vydání. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3129-2.

TALLMAN, Martin S. Therapy of acute promyelocytic leukemia: all-trans retinoic acid and beyond. *Leukemia (08876924)*, 1998, 12.

THIEDE, C. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* [online]. 2006, 107(10), 4011-4020 [cit. 2016-12-16]. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3167. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2005-08-3167>

TOMANCOVÁ, Alexandra, et al. Proteomická analýza nádorových buněk. *klinická onkologie*, 2009, 210.

TRIDENTE, Giuseppe. *Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors*. Academic Press, 2017. ISBN: 9780128094457

TRKA, J., et al. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*, 2002, 16.7: 1381-1389.

TSUZUKI, S., O. TAGUCHI a M. SETO. Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood* [online]. 2011, 117(14), 3858-3868 [cit. 2016-08-21]. DOI: 10.1182/blood-2010-11-320515. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-11-320515>

TURGEON, Mary Louise. *Clinical hematology: theory and procedures*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. ISBN 9780781750073.

VARA, Juan Ángel Fresno, Enrique CASADO, Javier DE CASTRO, Paloma CEJAS, Cristóbal BELDA-INIESTA a Manuel GONZÁLEZ-BARÓN. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* [online]. 2004, 30(2), 193-204 [cit. 2017-05-23]. DOI: 10.1016/j.ctrv.2003.07.007. ISSN 03057372. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737203001622>

VARDIMAN, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* [online]. 100(7), 2292-2302 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1199. ISSN 00064971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-04-1199>



- VERMA, Ramma Shanker; BONAVIDA, Benjamin (ed.). *Resistance to Immunotoxins in Cancer Therapy*. Springer, 2015, ISBN 978-3-319-17215-0
- VISSER, O., et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European journal of cancer*, 2012, 48.17: 3257-3266.
- VÍTÁMVÁS, Pavel, et al. Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-d dige) a její využití v proteomice. *Chem. Listy*, 2010, 104: 671-676.
- WARD, A. F., B. S. BRAUN a K. M. SHANNON. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood* [online]. 2012, 120(17), 3397-3406 [cit. 2017-05-21]. DOI: 10.1182/blood-2012-05-378596. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-05-378596>
- WARD, Alister C. *The Jak-Stat pathway in hematopoiesis and disease*. New York: Kluwer Academic/Plenum, c2002. ISBN 978-0-306-47424-8.
- WEISS, M. M., et al. Comparative genomic hybridisation. *Molecular Pathology*, 1999, 52.5: 243.
- WHITE, Thomas J., Norman ARNHEIM a Henry A. ERLICH. The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics* [online]. 1989, 5, 185-189 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/0168-9525(89)90073-5. ISSN 01689525. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168952589900735>
- WINTROBE, Maxwell Myer a John P. GREER. *Wintrobe's clinical hematology*. 12th ed. /. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2009. ISBN 9780781765077.
- YOUNES, Anas, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 2010, 363.19: 1812-1821.
- YURYEV, Anton. *PCR primer design*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2007. ISBN 9781597455282.
- ZABKIEWICZ, Joanna, et al. PDK1 Overexpression In Acute Myeloid Leukemia; Clinical Significance and Potential as a Therapeutic Target. *Blood*. [online]. 2010. 116:2162 [cit. 2017-06-24]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/116/21/2162>
- ZANDER, Dani S. *Molecular pathology of lung diseases*. New York: Springer, c2007. ISBN 978-0-387-72430-0.
- ZNEIMER, Susan Mahler. Cytogenetic abnormalities in myeloid disorders. *Cytogenetic Abnormalities: Chromosomal, FISH and Microarray-Based Clinical Reporting*, Wiley-Blackwell. 2014. ISBN 9781118412565.

## ZDROJE TABULEK

Tabulka 1 převzata a upravena dle:

O'BRIEN, Susan, Julie M. VOSE a Hagop KANTARJIAN. *Management of hematologic malignancies*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. ISBN 9780521896405. s. 1-25

Tabulka 2 převzata a upravena dle:

O'BRIEN, Susan, Julie M. VOSE a Hagop KANTARJIAN. *Management of hematologic malignancies*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. ISBN 9780521896405. s. 3-10

Tabulka 3 převzata a upravena dle:

O'BRIEN, Susan, Julie M. VOSE a Hagop KANTARJIAN. *Management of hematologic malignancies*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. ISBN 9780521896405.

s.228-256

VARDIMAN, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* [online]. 100(7), 2292-2302 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1199. ISSN 00064971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-04-1199>

Tabulka 4 převzata a upravena dle:

VARDIMAN, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* [online]. 100(7), 2292-2302 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1199. ISSN 00064971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-04-1199>

ADAM, Zdeněk; KREJČÍ, M.; VORLÍČEK, J. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008, 390 s. ISBN: 978-802-4725-024. s. 29-46

Tabulka 5, tabulka 6, tabulka 8, tabulka 9, tabulka 10, tabulka 11, tabulka13, tabulka 14, tabulka 15, tabulka 16, tabulka 18, tabulka 19, tabulka 24, tabulka 25, tabulka 27 a tabulka 28 převzata a upravena dle:

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, et al. EUCAN. *Hodgkin lymphom: Estimated incidence, mortality & prevalence for both sexes*, 2012. [cit. 2016-05-10] Dostupné z: <http://eco.iarc.fr/eucan/Default.aspx>

GLOBOCAN: *Estimated Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide in 2012*. IARC, 2014. [cit. 2016-05-10] Dostupné z: <http://www.iarc.fr>

Tabulka 7, tabulka 12 tabulka 17, tabulka 20, tabulka 24, tabulka 23, tabulka 26 převzata a upravena dle:

SIEGEL, Rebecca, Jiemin MA, Zhaohui ZOU a Ahmedin JEMAL. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2014, 64(1), 9-29 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/caac.21208. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21208>

SIEGEL, Rebecca L., Kimberly D. MILLER a Ahmedin JEMAL. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2015, 65(1), 5-29 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/caac.21254. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21254>

SIEGEL, Rebecca L., Kimberly D. MILLER a Ahmedin JEMAL. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2015, 65(1), 5-29 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/caac.21254. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21254>

SIEGEL, Rebecca L., Kimberly D. MILLER a Ahmedin JEMAL. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2015, 65(1), 5-29 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/caac.21254. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21254>

SIEGEL, Rebecca L., Kimberly D. MILLER a Ahmedin JEMAL. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2015, 65(1), 5-29 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/caac.21254. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21254>

JEMAL, A., T. MURRAY, E. WARD, A. SAMUELS, R. C. TIWARI, A. GHAFOR, E. J. FEUER a M. J. THUN. Cancer Statistics, 2005. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2005, 55(1), 10-30 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/canjclin.55.1.10. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.55.1.10>

JEMAL, A., T. MURRAY, E. WARD, A. SAMUELS, R. C. TIWARI, A. GHAFOR, E. J. FEUER a M. J. THUN. Cancer Statistics, 2005. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2005, 55(1), 10-30 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/canjclin.55.1.10. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.55.1.10>

JEMAL, A., R. SIEGEL, E. WARD, T. MURRAY, J. XU a M. J. THUN. Cancer Statistics, 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2007, 57(1), 43-66 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/canjclin.57.1.43. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.57.1.43>

JEMAL, A., R. SIEGEL, E. WARD, T. MURRAY, J. XU a M. J. THUN. Cancer Statistics, 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2007, 57(1), 43-66 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/canjclin.57.1.43. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.57.1.43>

JEMAL, A., R. SIEGEL, E. WARD, Y. HAO, J. XU a M. J. THUN. *Cancer Statistics*, 2009. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2009, 59(4), 225-249 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/caac.20006. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20006>

JEMAL, A., R. SIEGEL, E. WARD, Y. HAO, J. XU a M. J. THUN. *Cancer Statistics*, 2009. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2009, 59(4), 225-249 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.3322/caac.20006. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20006>

Tabulka 29:

Převzato a upraveno z protokolu ÚHKT – komplement laboratoří – úsek pro vědu a výzkum – oddělení HLA typizace – protokol typizace KIR genu

## ZDROJE OBRÁZKU

Obrázek 1: staženo dne 22.5.2016 z:

<https://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/nh/wcbmaturation.cfm>

<https://quizlet.com/81421867/wbc-morphology-flash-cards/>

Obrázek 2:

ERBER, Wendy N. (ed.). *Diagnostic techniques in hematological malignancies*. Cambridge University Press, 2010. ISBN: 978-05-117-6027-3. s. 130

Obrázek 3:

MUFTI, G. J., J. M. BENNETT, J. GOASGUEN, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica* [online]. 2008, 93(11), 1712-1717 [cit. 2016-06-13]. DOI: 10.3324/haematol.13405. ISSN 0390-6078. s. 1714

Dostupné z: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.13405>

ČERMÁK, J. Myelodysplastický syndrom–novinky v diagnostice a léčbě. *zdravi.euro.cz - Zdravotnictví a medicína Postgraduální medicína*, 2010, 6: 712-719. [cit. 2016-12-26].

Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/myelodysplasticky-syndrom-novinky-v-diagnostice-a-lecbe-452340>

Obrázek 4:

ERBER, Wendy N. (ed.). *Diagnostic techniques in hematological malignancies*. Cambridge University Press, 2010. ISBN: 978-05-117-6027-3, s. 51

Obrázek 5:

KUGLÍK, P.; Vranová, V.; Filková, H. Metody klasické a molekulární cytogenetiky v diagnostice mnohočetného myelomu. *Moderní diagnostické a prognostické nástroje pro mnohobetný myelom*. [online]. 2008. 21.1: 198-203 Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/144/3321.pdf>

Obrázek 6:

ERBER, Wendy N. (ed.). *Diagnostic techniques in hematological malignancies*. Cambridge University Press, 2010. ISBN: 978-05-117-6027-3, s. 76

Obrázek 7:

RAND, V., H. PARKER, L. J. RUSSELL, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [online]. 2011, 117(25), 6848-6855 s. 6851. [cit. 2016-07-25]. DOI:

10.1182/blood-2011-01-329961. ISSN 0006-4971. Dostupné z:

<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-01-329961>

Obrázek 8: staženo a upraveno dne 9.10.2016

<http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/genetika/index.php?pg=kapitola-iii-1--pojmy>

Obrázek 9:

VÍTÁMVÁS, PAVEL, et al. METODA DVOUROZMĚRNÉ DIFERENČNÍ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY (2-D DIGE) A JEJÍ VYUŽITÍ V PROTEOMICE. *Chem. Listy*, 2010, 104: s. 671

Obrázek 10:

PALANCA-WESSELS, M. C. a O. W. PRESS. Advances in the treatment of hematologic malignancies using immunoconjugates. *Blood* [online]. 2014, 123(15), 2293-2301 s.2294. [cit. 2016-11-23]. DOI: 10.1182/blood-2013-10-492223. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-10-492223>

Obrázek 11: staženo a upraveno dne 20.6.2017

<http://flipper.diff.org/app/pathways/1874>

Obrázek 12:

KLENER, Pavel. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vydání. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7. s: 85

Obrázek 13: staženo a upraveno dne 25.4.2017

[https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4350284\\_12964\\_2014\\_81\\_Fig5\\_HTML&query=&req=4&simCollection=PMC3053381\\_pone.0017727.g001&npos=165](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4350284_12964_2014_81_Fig5_HTML&query=&req=4&simCollection=PMC3053381_pone.0017727.g001&npos=165)Obrázek