

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

Jednonukleotidové polymorfizmy v patogenezi neoplazií ze zralých B-buněk

Diplomová práce

Bc. ANDREA WAGNEROVÁ

Vedoucí práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Kateřina Černá Pilátová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martina Mrkvicová, Ph.D.

Hradec Králové, 2022



Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 25. dubna 2022

.....
Andrea Wagnerová



Poděkování

Ráda bych využila možnosti velice poděkovat vedoucí mé diplomové práce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za prostudování práce a také připomínky k formální úpravě práce. Dále bych velmi ráda poděkovala Mgr. Kateřině Černé Pilátové, Ph.D. za konzultace a připomínky k teoretické i experimentální části, za její rady, ochotu a v neposlední řadě také RNDr. Bc. Ivetě Selingerové, Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování získaných dat.

Abstrakt

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Andrea Wagnerová

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D., Mgr. Kateřina Černá Pilátová, Ph.D.

Název diplomové práce: Jednonukleotidové polymorfizmy v patogenezi neoplazií ze zralých B-buněk

Chronická lymfatická leukémie (CLL – Chronic lymphocytic leukemia) je onemocnění charakterizované klonální proliferací B-lymfocytů. CLL patří mezi nejčastější lymfoproliferativní onemocnění s řadou definovaných rizikových faktorů, nicméně etiopatogeneze zůstává do jisté míry neobjasněna. V posledních 10–15 letech se objevují různé studie, které hovoří především o genetické predispozici k tomuto onemocnění. Působení vnějších faktorů v etiologii CLL prokázáno nebylo. V souvislosti s CLL je také definovaný asymptomatický stav, označovaný jako monoklonální B-lymfocytóza (MBL – Monoclonal B-cell lymphocytosis), často popisovaný jako prekurzorový k CLL.

Byla provedena imunofenotypizace lymfocytů průtokovou cytometrií u jedinců v kontrolní skupině (100 osob) a ve skupině CLL/MBL (pacienti s diagnózou CLL nebo MBL, 50 osob). U všech jedinců kontrolní a CLL/MBL skupiny byly vyšetřeny vybrané genetické polymorfizmy (rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985), které byly v jiných studiích asociovány s výskytem CLL, MBL. Cílem bylo porovnat zastoupení genotypů u kontrolní a CLL/MBL skupiny a zhodnotit asociaci testovaných jednonukleotidových polymorfizmů s onemocněním CLL, MBL se zaměřením na pacienty, u nichž byla současně diagnostikována solidní malignita.

Pacientům z CLL/MBL skupiny byla na základě výsledků stanovení krevního obrazu, analýzy periferní krve průtokovou cytometrií stanovena diagnóza CLL (37 případů), v případě nenaplnění početních (nízký počet klonálních B-lymfocytů) či klinických kritérií byla stanovena diagnóza MBL (13 případů). Pacienti s diagnózou MBL byli kategorizováni do skupiny s nízkým nebo vysokým počtem cirkulujících klonálních B-lymfocytů. Výsledný imunofenotyp všech pacientů byl stejný: typický pro klonální buňky CLL (CD5+ CD23+ CD20^{dim}). Jeden z 5 vyšetřovaných polymorfizmů, rs735665, byl stanoven jako signifikantní pro zvýšené riziko onemocnění CLL i MBL ($p = 0,007$). V souvislosti s počtem rizikových alel v genotypu byl pozorován trend ke zvýšenému riziku onemocnění CLL nebo MBL při vyšším zastoupení rizikových alel u polymorfizmů (rs17483466, rs735665, rs7176508, rs13397985).

V patogenezi onemocnění CLL i MBL se uplatňuje celé spektrum faktorů. Rizikovým faktorem je prokazatelně vyšší věk jedince. Dalším významným faktorem je rodinná anamnéza – zejména prvostupňoví příbuzní pacientů s CLL mají vyšší riziko rozvoje CLL (tzv. familiární forma) než je tomu u pacientů bez rodinné zátěže. S tím souvisí genetická predispozice k CLL/MBL, tedy změny na chromozomální i molekulární úrovni.

Abstract

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Andrea Wagnerová

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D., Mgr. Kateřina Černá Pilátová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Single nucleotide polymorphism in the pathogenesis of mature B-cell neoplasms

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a disease characterized by clonal proliferation of B-lymphocytes. CLL is a lymphoproliferative disorder with a number of defined risk factors, but its etiopathogenesis remains unresolved to some degree. Over the past 10-15 years, there have been several studies that primarily suggest a genetic predisposition to the disease. The influence of external factors on the etiology of CLL has not been demonstrated. There is also a defined asymptomatic condition associated with CLL called monoclonal B-lymphocytosis, which is often referred to as a precursor of CLL.

Immunophenotyping of lymphocytes by flow cytometry was performed in subjects of the control group (100 subjects) and the CLL/MBL group (patients diagnosed with CLL or MBL, 50 subjects). All subjects in the control and CLL/MBL groups were screened for selected genetic polymorphisms (rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985) that have been associated with the occurrence of CLL and MBL in other studies. The aim of this work was to compare the representation of the genotypes in the control and CLL/MBL groups and to evaluate the association of the tested single nucleotide polymorphisms with CLL, MBL disease.

Patients in the CLL/MBL group were diagnosed with CLL (37 cases) based on the results of blood counts and peripheral blood flow cytometry analyses, and with MBL (13 cases) if numerical (low number of clonal lymphocytes) or clinical criteria were not met. Patients diagnosed with MBL were divided into a group with low or high numbers of circulating clonal B-lymphocytes. The resulting immunophenotype was the same in all patients: typical of clonal CLL cells (CD5⁺ CD23⁺ CD20^{dim}). One of the 5 polymorphisms studied, rs735665, was found to be significant for increased risk of both CLL and MBL disease ($p = 0.007$). A trend towards increased risk for CLL or MBL disease was observed depending on the number of risk alleles in the genotype with a higher proportion of risk alleles in the polymorphisms (rs17483466, rs735665, rs7176508, rs13397985).

A whole spectrum of factors comes into play in the pathogenesis of both CLL and MBL disease. A demonstrably older age of the individual is one risk factor. Another important factor is family history – in particular, first-generation relatives of patients with CLL have a higher risk of developing CLL (the so-called familial form) than those without a family history. Associated with this is a genetic predisposition to CLL/MBL, i.e. changes at the chromosomal and molecular level.

Obsah

1	Úvod	8
2	Lymfocytóza	9
2.1	Benigní lymfocytóza	9
2.2	Maligní lymfocytóza	10
2.2.1	Monoklonální B-lymfocytóza.....	12
3	Neoplazie z lymfoidní tkáně	13
3.1	Neoplazie ze zralých B-buněk	13
3.2	Chronická lymfatická leukémie/lymfom z malých lymfocytů CLL/SLL.....	14
3.2.1	Stanovení diagnózy	15
3.2.2	Etiopatogeneze	17
3.2.3	Genetická predispozice	18
3.2.4	Zdravotní komplikace u CLL	19
3.2.5	Deregulace imunitního systému	19
3.2.6	Lymfoproliferativní onemocnění a solidní tumory.....	20
4	Jednonukleotidový polymorfismus	21
4.1	SNP a onemocnění	21
4.1.1	SNP spojené s rizikem CLL	22
5	Průtoková cytometrie.....	23
5.1	Princip průtokové cytometrie	23
5.2	Instrumentace	23
6	Real-time PCR	27
6.1	Princip real-time PCR	27
7	Cíle diplomové práce.....	29
8	Materiál a metody	30
8.1	Imunofenotypizace lymfocytů	31
8.1.1	Denní kontrola kvality	31
8.1.2	Fluorochromem konjugované protilátky.....	31
8.1.3	Příprava směsi monoklonálních protilátek.....	32
8.1.4	Příprava vzorku pro analýzu.....	33
8.1.5	Analýza průtokovým cytometrem Navios EX	34

8.1.6	Nastavení průtokového cytometru Navios EX Beckman Coulter	35
8.1.7	Strategie určení imunofenotypu buněk.....	36
8.2	Molekulární diagnostika pomocí PCR	40
8.2.1	Detekce SNP rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985.....	40
8.2.2	Hybridizační sondy	40
8.2.3	Izolace DNA.....	41
8.2.4	Příprava analýzy	41
8.2.5	Instrumentace	42
8.2.6	Interpretace analýzy genové exprese.....	42
9	Výsledky	44
9.1	Statistická analýza	45
9.2	Imunofenotypizace lymfocytů	45
9.3	Záchyt onemocnění CLL nebo MBL u pacientů se solidním tumorem.....	46
9.4	Genotypizace: Zastoupení alel a genotypů v celém souboru jedinců	47
9.5	Zastoupení polymorfizmů u pacientů s CLL/MBL a kontrolní skupiny	49
9.6	Asociace genotypů s onemocněním CLL/MBL	49
10	Diskuze	54
10.1	Algoritmus laboratorní detekce MBL	55
10.2	Hodnocení závislosti onemocnění CLL, MBL na věku a pohlaví	55
10.3	CLL a solidní malignita	57
10.4	Hodnocení rizikových faktorů vývoje MBL v CLL	57
10.5	Asociace polymorfizmů rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985 s onemocněním CLL.....	58
11	Závěr.....	63

1 Úvod

Neoplazie ze zralých B-buněk jsou velmi heterogenní skupinou lymfoproliferativních onemocnění. Nejčastěji zastoupenou malignitou z B-buněk, které jsou na základě morfologie a imunofenotypizace určeny jako zralé, je chronická lymfatická leukémie, které je diplomová práce věnována především. Chronická lymfatická leukémie je charakterizovaná proliferací malých klonálních B-lymfocytů s typickým imunofenotypem (CD5+ CD23+ CD20^{dim}) v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách či jiných orgánech. V případě, že není naplněno početní kritérium pro stanovení diagnózy CLL ($\geq 5 \times 10^9/l$ buněk typu CLL v periferní krvi), ale je přítomné orgánové postižení, může být diagnostikován lymfom z malých B-buněk. V současnosti se na základě početních a klinických kritérií od onemocnění chronické lymfatické leukémie odlišuje asymptomatický stav, označovaný jako monoklonální B-lymfocytóza (Delgado et al. 2020).

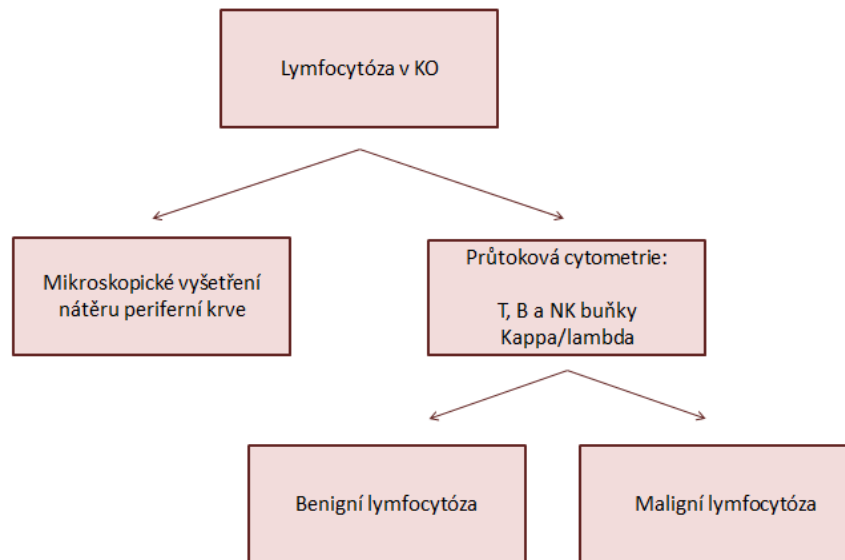
Laboratorní diagnostika chronické lymfatické leukémie i monoklonální B-lymfocytózy se ve většině případů opírá především o stanovení krevního obrazu (absolutního počtu lymfocytů), určení imunofenotypu a klonality B-lymfocytů (Smolej et al. 2021). Robustnější využití moderních hematologických analyzátorů může přispět k dřívějšímu laboratornímu záchytu MBL nebo CLL, a to zejména správnou interpretací suspektního hlášení automatických hematologických analyzátorů, které může být vhodně využito v kontextu se záchytem MBL, jako nemaligního prekurzoru onemocnění CLL.

Přestože se jedná o velmi časté onemocnění s incidencí 5/100 000 osob v České republice (Národní onkologický registr – ÚZIS ČR), není etiopatogeneze onemocnění zcela objasněna a vyžaduje další výzkumnou práci. V patogenezi CLL se jeví významně genetická predispozice. U 5–10 % pacientů je popisována familiární varianta CLL, kde se riziko onemocnění CLL zvyšuje zejména u příbuzných prvního stupně. Dále mohou být u nemocných pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace identifikovány chromozomové aberace. Řada studií se věnuje změnám na molekulární úrovni, konkrétně změnám v pořadí nukleotidů, tzv. jednonukleotidovým polymorfizmům (SNP – Single nucleotide polymorphisms). V souvislosti s identifikací jednonukleotidových polymorfizmů se hovoří o asociaci určitých SNP s diagnózou CLL a MBL (Strati et al. 2015). Zajímavým aspektem je zvýšený výskyt CLL u pacientů se solidními malignitami, jak popisují van den Broek et al. (2014), Sládková (2019).

Validace SNP testovaných v předešlých studiích či identifikace nových SNP stejně jako jiných markerů patogeneze onemocnění CLL by mohlo přispět k vývoji cílené terapie, individualizaci prognostických faktorů u jedince.

2 Lymfocytóza

Lymfocytóza je u dospělých jedinců definovaná jako zvýšení absolutního počtu lymfocytů nad $4 \times 10^9/l$ periferní krve. V diferenciální diagnostice zvýšeného počtu lymfocytů (Obrázek 1) je zásadní rozlišit etiologii lymfocytózy (Hamad et al. 2020).



Obrázek 1: Rozlišení etiologie lymfocytózy

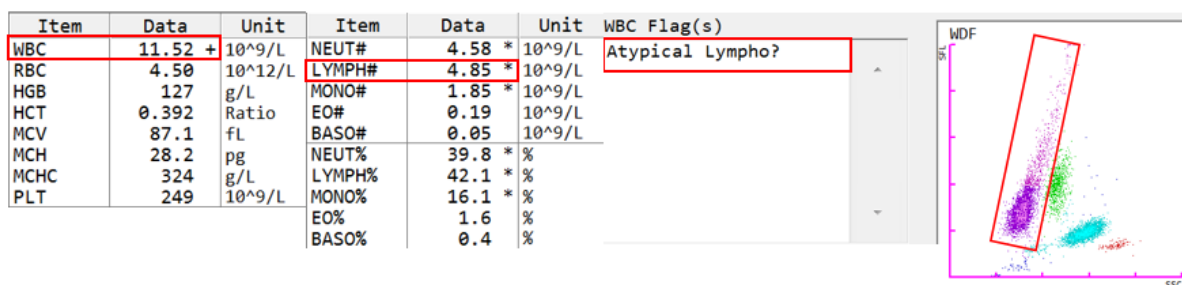
Na obrázku je znázorněný algoritmus laboratorního vyšetření při prvním záchytu lymfocytózy (bez kontextu s klinickým stavem či historií pacienta) v krevním obraze užívaný na Oddělení laboratorní medicíny Masarykova onkologického ústavu (OLM MOÚ).

U lymfocytózy zjištěné při stanovení krevního obrazu je nutné rozlišit, zda se jedná o benigní lymfocytózu či maligní. Morfologii lymfocytů charakterizujeme na základě mikroskopického vyšetření nátěru periferní krve. Pro určení zastoupení jednotlivých populací lymfocytů a prokázání případné klonality lymfocytů slouží moderní laboratorní metoda, průtoková cytometrie (George 2012).

Za normálních okolností osídlují periferní krev zralé lymfocyty normální morfologie. Jsou polyklonální a převažují T-lymfocyty (CD3+ lymfocyty). Při mikroskopickém vyšetření nátěru periferní krve jsou popisovány jako malé buňky s kulatým či oválným jádrem, hutným jaderným chromatinem. Cytoplazma je jemně bazofilní a tvoří úzký lem kolem jádra (Haferlach et al. 2014).

2.1 Benigní lymfocytóza

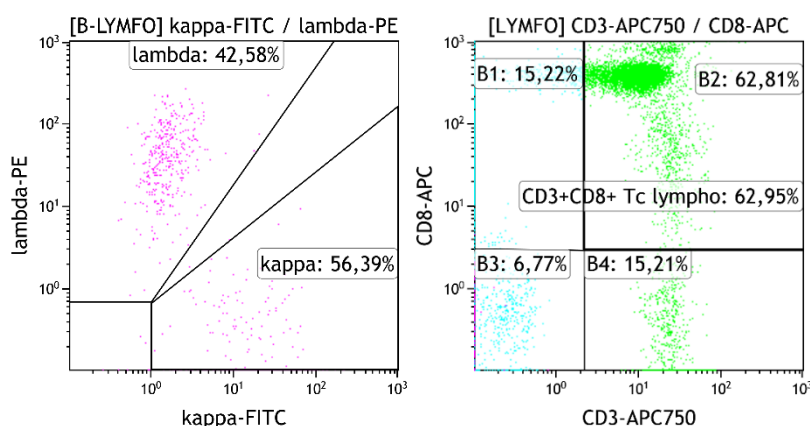
Benigní lymfocytózu lze označit jako reaktivní. Zvýšený počet lymfocytů (Obrázek 2) tedy můžeme detekovat i u pacientů bez hematologického onemocnění v anamnéze. U pacienta můžeme laboratorně prokázat jiné onemocnění, které provází zvýšená hodnota lymfocytů. V takovém případě se po odeznění onemocnění hodnota lymfocytů normalizuje. Morfologie lymfocytů vykazuje nejen v těchto případech značnou variabilitu. Existují různé příčiny reaktivní lymfocytózy (Obrázek 3, zvýšené CD8+ T-lymfocyty), například virové (infekce virem EBV), bakteriální onemocnění (George 2012).



Obrázek 2: Hodnoty leukocytů a lymfocytů, scattergram populací leukocytů z analyzátoru Sysmex XN-2000

V červeně ohraničených částech obrázku vidíme vyšší hodnotu leukocytů (WBC – White blood cell), lymfocytů (LYMPH – Lymphocyte), suspektní hlášení Atypical Lympho? a v pravé části grafické zobrazení populace leukocytů z analyzátoru Sysmex XN-2000.

Při stanovení krevního obrazu mohou být naměřeny hodnoty mimo referenční rozmezí. Při zjištění vyšší hodnoty leukocytů nebo lymfocytů můžeme provést nátěr periferní krve pro morfologický popis buněk. Dále je možné pro zjištění imunofenotypu lymfocytů provést vyšetření periferní krve průtokovou cytometrií.



Obrázek 3: Reaktivní lymfocytóza – scattergramy získané z průtokového cytometru, software Kaluza Analysis 2.1

Pro identifikaci imunofenotypu lymfocytů v periferní krvi se provádí vyšetření průtokovou cytometrií. Ke grafickému znázornění slouží tzv. scattergramy. Vyšší procentuální zastoupení CD8+ T-lymfocytů a normální poměr povrchových lehkých řetězců imunoglobulinu (kappa/lambda) na B-lymfocytech může značit lymfocytózu reaktivního původu. V levé části obrázku znázorňuje scattergram expresi povrchových lehkých řetězců kappa/lambda (poměr κ/λ je normální, $\kappa/\lambda = 1,32$) na B-lymfocytech. Na ose y je lambda, použitý fluorochrom je PE. Na ose x je kappa, použitý fluorochrom je FITC (Fluorescein isothiocyanate, fluorescein isothiokyanát). V pravé části obrázku je znázorněno zastoupení cytotoxických CD8+ CD3+ T-lymfocytů z lymfocytů (63 %): na ose y znak CD8, použitý fluorochrom je APC (Allophycocyanin). Na ose x je znak CD3, použitý fluorochrom je APC750 (Allophycocyanin-Alexa Fluor 750).

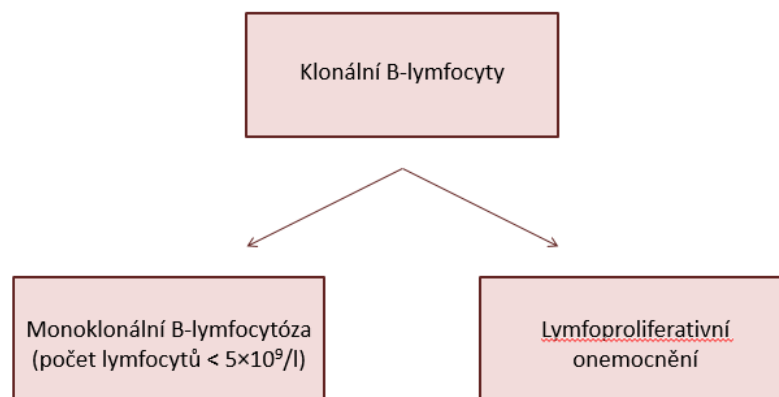
2.2 Maligní lymfocytóza

Etiologie zvýšeného počtu lymfocytů může být kromě benigní lymfocytózy, která je častějším nálezem, také maligní lymfocytóza. V takovém případě dochází ke zvýšení počtu lymfocytů v důsledku akutního či chronického onemocnění, tj. akutní lymfoblastické leukémie (neoplazie z prekursorových buněk) nebo chronického lymfoproliferativního onemocnění (lymfoidní neoplazie ze zralých buněk) (Penka et al.

2011). Na možnou přítomnost patologických lymfocytů může pracovníka laboratoře upozornit také suspektní hlášení automatických hematologických analyzátorů (např. hlášení „Abn Lympho?“ u hematologického analyzátoru firmy Sysmex).

Klonální nádorová lymfoproliferativní onemocnění ze zralých buněk mohou vycházet z T či B buněčné linie nebo NK buněk (NK – natural killer, přirození zabíječi). Nejčastěji se jedná o lymfoidní neoplazie B buněčné (Obrázek 4), kterým bude věnována tato práce. (Penka et al. 2011)

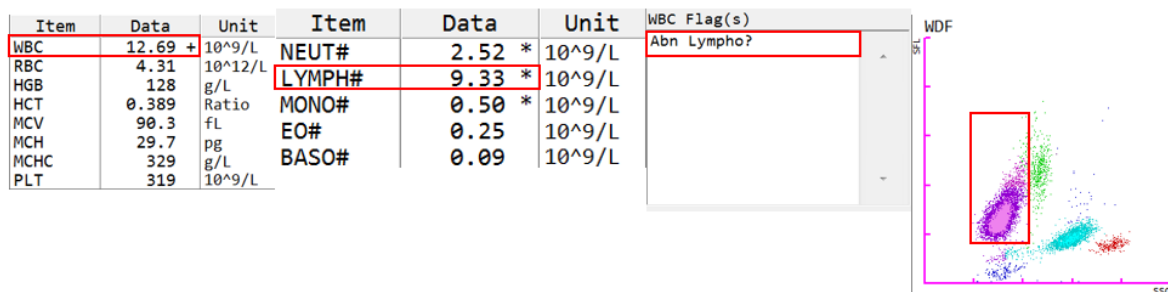
Mezi nejčastější nálezy patří chronická lymfatická leukémie a monoklonální B-lymfocytóza. MBL je asymptomatický stav s laboratorně prokázanou expanzí B-lymfocytů s typickým imunofenotypem v periferní krvi (nejčastěji imunofenotyp odpovídající buňkám CLL) (Maitre and Troussard 2019).



Obrázek 4: Rozlišení MBL a B-lymfoproliferace

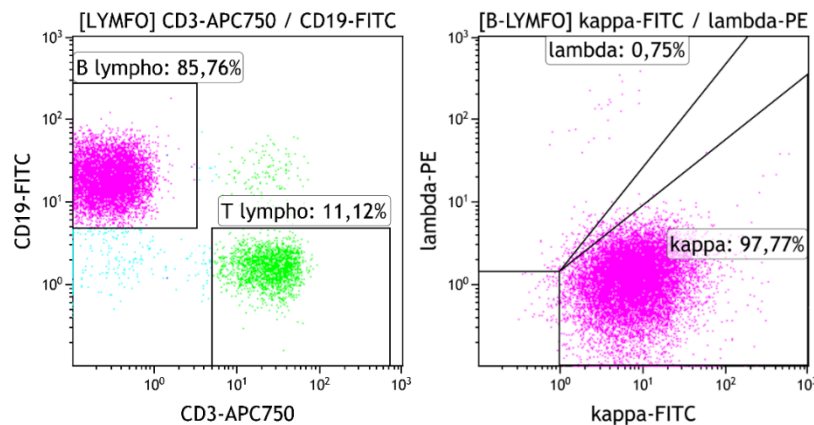
Pro průkaz lymfoproliferativního onemocnění je možné využít kombinaci několika metod: stanovení krevního obrazu (Obrázek 5), imunofenotypu lymfocytů, klinického vyšetření pacienta, zobrazovací metody, nebo histologického vyšetření kostní dřeně (Penka et al. 2011).

S maligní lymfocytózou se setkáváme u pacientů s diagnózou lymfoidní neoplazie v anamnéze. V takovém případě jsou lymfocyty atypické svou velikostí, tvarem, charakterem chromatinu či cytoplazmy. Lymfocyty jsou klonální, s imunofenotypem charakteristickým pro danou lymfoidní neoplazii (Obrázek 6). S klonální expanzí lymfocytů se můžeme setkat i u stavů popisovaných jako monoklonální B-lymfocytóza (George 2012).



Obrázek 5: Hodnoty leukocytů a lymfocytů, scattergram populací leukocytů z analyzátoru Sysmex XN-2000

Na analyzátoru byl změněn vzorek periferní krve odebraný do K₃EDTA. Ve výsledku krevního obrazu byla zjištěna vyšší hodnota leukocytů (WBC), lymfocytů (LYMPH) a suspektní hlášení analyzátoru Abn Lympho?. V pravé části obrázku je vidět rozdělení leukocytárních populací s dominancí lymfocytů (červeně ohraničená populace).



Obrázek 6: Maligní lymfocytóza – scattergramy získané z průtokové cytometrie, software Kaluza Analysis 2.1

V levé části obrázku je vidět vyšší procentuální zastoupení buněk CD19+, tedy B-lymfocytů (osa y, použitý fluorochrom FITC) a v pravé části obrázku abnormální poměr povrchových lehkých řetězců imunoglobulinu ($\kappa/\lambda = 130,36$) na B-lymfocytech. Zvýšené zastoupení B-lymfocytů a zjištění klonality povrchových lehkých řetězců imunoglobulinů kappa/lambda v periferní krvi je charakteristickou známkou lymfoproliferativního onemocnění z B-buněk, tj. B-lymfocyty = 86 % z lymfocytů, povrchové lehké řetězce na B-lymfocytech: lambda = 0,75 %, povrchové lehké řetězce kappa = 98 %.

2.2.1 Monoklonální B-lymfocytóza

Monoklonální B-lymfocytóza je stav, kdy počet cirkulujících klonálních B-lymfocytů nedosahuje počtu $5 \times 10^9/l$ periferní krve (Strati et al. 2015).

Obecně je popisováno, že se nejčastěji jedná o buňky s imunofenotypem typickým pro CLL (70 %), tj. CD19+ CD5+ CD23+ a s restrikcí povrchových lehkých řetězců imunoglobulinu (kappa nebo lambda) (Strati et al. 2015). S podobnými výsledky (75 % případů s imunofenotypem typickým pro CLL) se setkáváme také u Arena and Musto (2014). Pro monoklonální B-lymfocytózu je charakteristická absence klinických příznaků a orgánového postižení (Strati et al. 2015).

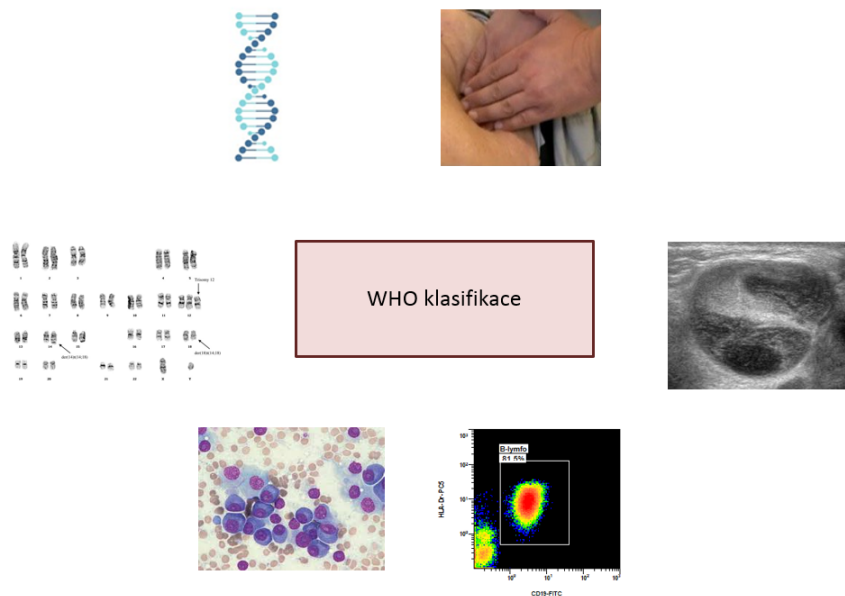
MBL je možné označit za prekurzor CLL či jiného lymfoproliferativního onemocnění z B buněk (dle imunofenotypu buněk). Mezi rizikové faktory rozvoje MBL patří stejně jako např. u CLL vyšší věk jedince, mužské pohlaví, genetické polymorfizmy či infekce. Také v rozvoji MBL se předpokládá vliv genetické predispozice (Strati et al. 2015).

V některých případech byla také prokázána asociace mezi MBL a jednonukleotidovými polymorfizmy a některé z nich jsou také spojeny s rozvojem CLL. Ve studii Calligaris-Cappio and Federico (2011) je zmíněno 9 testovaných SNP s cílem prokázat asociaci mezi genotypem a rozvojem MBL, z nichž 6 SNP bylo určených jako statisticky významných pro asociaci mezi genotypem a rozvojem MBL (rs17483466, rs13397985, rs757978, rs872071, rs2456449 a rs735665) (Crowther-Swanepoel et al. 2010). V novější studii se autoři shodují s předchozími studiemi a taktéž popisují asociaci SNP s rizikem MBL v 6 lokusech a celkově byla zhodnocena asociace SNP s rizikem rozvoje MBL v 18 lokusech z 37 testovaných lokusů (41 SNP) (Kleinstern et al. 2022).

3 Neoplazie z lymfoidní tkáně

Lymfoproliferativní onemocnění vycházejí z různých stádií vývoje lymfocytů. Rozlišujeme malignity z prekursorových buněk, tj. lymfoblastů a malignity, které vycházejí ze zralých lymfocytů. Maligní onemocnění z prekursorových buněk lymfocytů označujeme jako lymfoblastické leukémie/lymfomy. Druhou velkou skupinou lymfoidních neoplazií jsou neoplazie ze zralých B či T lymfocytů nebo NK buněk (Kačírková et al. 2007).

Lymfoidní neoplazie jsou v současné době klasifikovány pomocí WHO klasifikace (WHO – World Health Organization, Světová zdravotnická organizace) lymfoidních neoplazií z roku 2016 (Obrázek 7), která zahrnuje jak klinické, tak laboratorní vyšetření (Swerdlow et al. 2016).



Obrázek 7: WHO klasifikace lymfoidních neoplazií – vyšetření

WHO klasifikace lymfoidních neoplazií z roku 2016 zahrnuje komplexní přístup. Jedná se o klinické vyšetření, zobrazovací metody, histologické/immunocytochemické vyšetření kostní dřeně, imunofenotypizaci lymfocytů, cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření.

3.1 Neoplazie ze zralých B-buněk

Neoplazie ze zralých B-buněk jsou lymfoproliferativní klonální nádorová onemocnění, která vycházejí z buněk B-buněčné linie. Jsou charakterizovány proliferací B-lymfocytů, které jsou na základě morfologie a imunofenotypu určeny jako zralé (Kačírková et al. 2007).

Neoplazie ze zralých B-buněk patří k nejčastějším lymfoidním neoplaziím na celém světě. Jedná se o velmi heterogenní skupinu onemocnění (Tabulka 1). Tato klonální nádorová onemocnění postihují periferní krev, kostní dřeň nebo lymfatickou tkáň střeva, uzlin apod. (Penka et al. 2011).

V případě, že nádorové buňky osídlují kostní dřeň či jinou lymfatickou tkáň, hovoříme o lymfomu. Stavy, které se manifestují přítomností nádorové populace v periferní krvi od počátku onemocnění, označujeme jako leukémie. V situacích, kdy je periferní krev postižena jako následek progredující choroby, hovoříme o leukemizovaném lymfomu (Penka et al. 2011).

Pro definitivní laboratorní průkaz choroby je stěžejní komplexní přístup, který se opírá o stanovení krevního obrazu, imunofenotypizaci lymfocytů, histologické nebo molekulárně genetické vyšetření (Kačírková et al. 2007).

Tabulka 1: Přehled nejčastějších vyzrálých neoplazií z B-buněk (Swerdlow et al. 2016)

Monoklonální B-lymfocytóza
Chronická lymfatická leukémie, lymfom z malých B-buněk (CLL/SLL)
Splenický lymfom z marginální zóny
B prolymfocytární leukémie
Vlasatobuněčná leukémie
Lymfoplazmocytární lymfom
Monoklonální gamapatie nejasného významu
Plazmocelulární myelom
Folikulární lymfom
Lymfom z plášťových buněk (MCL – Mantle cell lymphoma)
Difuzní velkobuněčný lymfom
Burkittův lymfom

V klinickém obraze pacientů se vyskytují tzv. B příznaky, tj. váhový úbytek, noční pocení, teploty, zvětšení uzlin, jater či sleziny. Komplikací lymfoproliferativního onemocnění může být autoimunitní hemolytická anémie (AIHA – Autoimmune hemolytic anemia) nebo imunitní trombocytopenie (ITP – Immune thrombocytopenic purpura) (Penka et al. 2011).

3.2 Chronická lymfatická leukémie/lymfom z malých lymfocytů CLL/SLL

CLL je nejčastější leukémií zejména starších lidí západní polokoule. V České republice je incidence onemocnění cca 5 případů na 100 000 obyvatel (údaj za období 2014–2018) (Národní onkologický registr – ÚZIS ČR).

Podstatou onemocnění je proliferace malých B-lymfocytů, které jsou pomocí průtokové cytometrie určeny jako klonální buňky s expresí povrchových antigenů typických pro CLL (Doubek et al. 2012). Nádorovou populaci představují klonální malé B lymfocyty s typickým fenotypem CD19+ CD5+ CD23+ a sníženou expresí CD20 (Navrkalová et al. 2015).

Léčbu CLL je nutné individualizovat s ohledem na věk, přidružená onemocnění i prognózu konkrétního onemocnění. V některých případech je doporučováno monitorování klinického stavu pacienta bez zahájení léčby (Hallek et al. 2018). Zahájení léčby je indikováno s ohledem na stádium onemocnění či jeho aktivitu. Pro průkaz aktivity onemocnění musí být splněno alespoň jedno z kritérií, jako progresse anémie či trombocytopenie v důsledku postižení kostní dřeně, masivní nebo progredující splenomegalie nebo lymfadenopatie. Pro aktivitu onemocnění CLL může být taktéž signifikantní vzestup lymfocytů v periferní krvi (zvýšení počtu lymfocytů o více než 50 % původního počtu lymfocytů za dobu kratší než 6 měsíců), autoimunitní anémie/trombocytopenie neodpovídající na léčbu a v neposlední řadě

některý ze systémových příznaků souvisejících s onemocněním (úbytek hmotnosti, únava, noční pocení, horečky) (Smolej et al. 2021).

K léčbě CLL mohou být využity například kinázové inhibitory ibrutinib a idelalisib, inhibující signální dráhy B-buněčného receptoru (BCR) a venetoklax, jako selektivní inhibitor Bcl-2 (B-cell lymphoma) (Smolej et al. 2021). Z dalších možností léčby lze zmínit rituximab, který vazbou na antigen CD20 na povrchu B-lymfocytů způsobuje jejich eliminaci z krevního oběhu. Eliminace B-lymfocytů je zprostředkována mechanismy imunitní odpovědi. Dále bylo prokázáno, že vazbou rituximabu na antigen CD20 na povrchu B-lymfocytů dochází k navození apoptické smrti (Belada 2010). Pokyny nejen pro diagnostiku, ale i léčbu vycházejí z doporučení WHO (Hallek et al. 2018).

3.2.1 Stanovení diagnózy

Stanovení diagnózy CLL je možné na základě kritérií, která byla aktualizována Mezinárodní pracovní skupinou pro CLL a Světovou zdravotnickou organizací (Tabulka 2) (Mora et al. 2018).

Tabulka 2: Diagnostická kritéria CLL dle International Workshop on CLL (IWCLL) (Hallek et al. 2018)

Klonální B-lymfocyty v periferní krvi $> 5 \times 10^9/l$

Morfologicky ≤ 55 % atypických buněk (např. prolymfocyty) v periferní krvi

Typický imunofenotyp

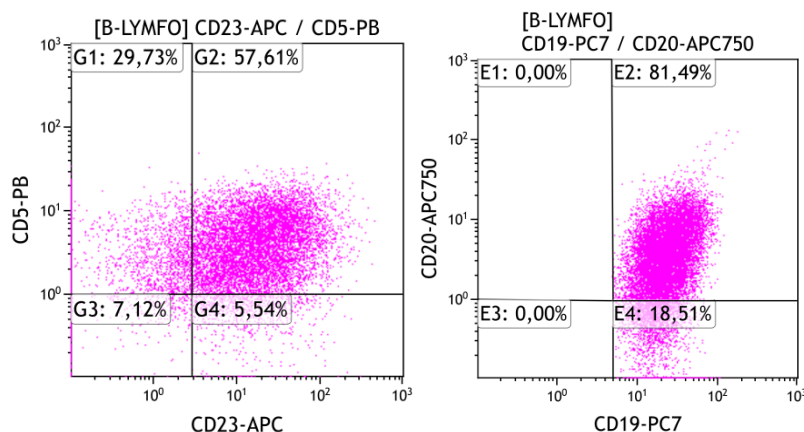
Počet klonálních B-lymfocytů musí být pro stanovení diagnózy CLL vyšší než $5 \times 10^9/l$ periferní krve. Pro laboratorní potvrzení diagnóz CLL obvykle postačí stanovení krevního obrazu včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů na automatickém hematologickém analyzátoru a imunofenotypu lymfocytů pomocí průtokové cytometrie (Hallek et al. 2018).

Jiné laboratorní metody, jako například FISH (Fluorescence in situ hybridization, fluorescenční *in situ* hybridizace) pro detekci chromozomálních aberací, nejsou nezbytnou ani rutinní součástí skupiny testů určených pro diagnostiku CLL (Hallek et al. 2018). Vyšetření kostní dřeně je obvykle prováděno pro objasnění etiologie změn ve výsledcích krevního obrazu (např. anémie) a histologické vyšetření mízní uzliny je prováděno v indikovaných případech, kdy není jasný imunofenotyp patologického klonu lymfocytů v periferní krvi nebo při podezření na transformaci CLL do jiné progresivnější formy s často asymetrickou lymfadenopatií a významnými B-symptomy (tzv. Richterův syndrom), nejčastěji difúzního velkobuněčného lymfomu (Hadrabová 2015).

Typický imunofenotyp B-lymfocytů, který obvykle postačuje pro stanovení CLL (laboratorně) je CD19+ CD5+ CD23+ (Obrázek 8) a restrikce povrchových řetězců kappa nebo lambda. K upřesnění diagnózy mohou sloužit i další markery exprimované na povrchu B-lymfocytů, např. CD20 (snížená exprese na buňkách CLL, tj. CD20dim), CD200 (silně exprimován na buňkách CLL), CD79b (slabě exprimován na buňkách CLL), CD10 (negativní na buňkách CLL) (Hallek et al. 2018).

K odlišení od jiného tzv. CD5 pozitivního lymfoproliferativního onemocnění (konkrétně MCL) je vhodné využít znak CD200, který je u CLL exprimován silně. Stejně tak u pacientů, u kterých byla na základě stanovení imunofenotypu buněk diagnostikována atypická CLL, byla patrná exprese znaku

CD200. Tyto informace vycházejí ze studií od Palumbo et al. (2009), Špačka et al. (2014), Mora et al. (2018) či Ting et al. (2018).

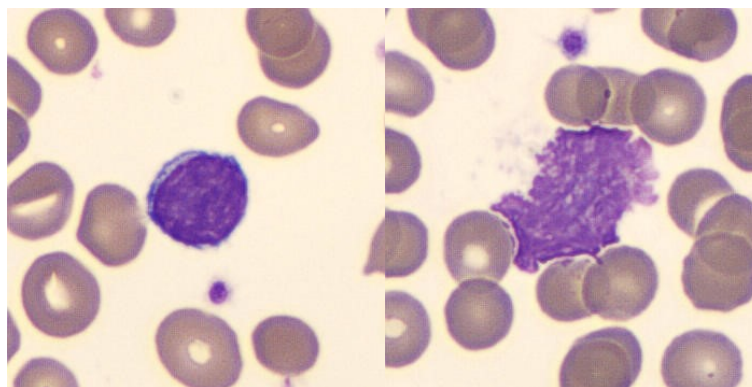


Obrázek 8: CD znaky typické CLL – scattergramy z průtokové cytometrie, software Kaluza Analysis 2.1

Na scattergramech vidíme pozitivitu znaku CD5, CD23 a sníženou expresi znaku CD20 na B-lymfocytech. Imunofenotyp B-lymfocytů CD5+ CD23+ CD20dim je charakteristický pro patologické lymfocyty prolifерující v rámci CLL. V levé části obrázku je na ose y znak CD5, použitým fluorochromem je PB (Pacific Blue); na ose x jsou vyobrazeny buňky exprimující na svém povrchu znak CD23 a použitým fluorochromem je APC750. V pravé části obrázku je na ose y znak CD20, použitým fluorochromem je APC750; na ose x jsou vyobrazeny buňky exprimující znak CD19, použitým fluorochromem je PC7.

Pokud hodnoty klonálních lymfocytů v periferní krvi nedosahují hodnoty $5 \times 10^9/l$ periferní krve, ale mají typický imunofenotyp CD5+ CD23+, hovoříme o monoklonální B-lymfocytóze s imunofenotypem CLL. Pokud je současně přítomné orgánové postižení (lymfadenopatie, splenomegalie, hepatomegalie), může se jednat o lymfom z malých lymfocytů (Doubek et al. 2012). Zásadním rozdílem mezi CLL a SLL je absence kritéria periferní lymfocytózy. Je-li to možné, a při současně nepřítomnosti patologického klonu B-lymfocytů v periferní krvi či kostní dřeni, by měla být diagnóza SLL potvrzena histologickým vyšetřením mízní uzliny. V případě cytopenie v periferní krvi v důsledku infiltrace kostní dřene nádorovými buňkami (patologickými lymfocyty) je podle doporučení (IWCLL z roku 2018) stanovena diagnóza CLL bez ohledu na počet lymfocytů v periferní krvi (Hallek et al. 2018).

Morfologický nález u typické formy CLL/SLL je obvykle představován uniformní populací lymfocytů. Tyto patologické buňky jsou o něco větší než normální malý zralý lymfocyt, s kulatým lehce excentricky uloženým jádrem, hutným/kondenzovaným chromatinem. Cytoplazma je slabě bazofilní a obvykle tvoří úzký lem kolem jádra buňky (vysoký N/C poměr). V nátěru periferní krve nacházíme také četné jaderné stíny, tzv. Gumprechtovy stíny (Obrázek 9) (Penka et al. 2011).



Obrázek 9: Lymfocyt u typické formy CLL, jaderný stín

Při nejasném imunofenotypu buněk, odlišení CLL od ostatních lymfoproliferací, lze v rámci diferenciální diagnostiky využít skórovací systém Royal Marsden (Tabulka 3). Zmíněný skórovací systém je možné využívat, nicméně základní diagnostická kritéria CLL jsou aktualizována Mezinárodní pracovní skupinou pro CLL a Světovou zdravotnickou organizací, viz Tabulka 2 a začátek kapitoly 3.2.1 (Mora et al. 2018).

Tabulka 3: Royal Marsden (Matutes) skóre pro stanovení diagnózy CLL průtokovou cytometrií

CD antigen	Body podle intenzity exprese znaku	
	1	0
CD5	Pozitivní	Negativní
CD23	Pozitivní	Negativní
slg (Surface immunoglobulin)	Slabě pozitivní	Silně pozitivní
CD79b	Slabě pozitivní	Silně pozitivní
FMC7	Negativní	Pozitivní

Vysoké skóre (4–5 bodů) je u většiny případů CLL, ostatní lymfoproliferace mají skóre nízké (1–2 body) (Moreau et al. 1997).

3.2.2 Etiopatogeneze

Etiologie onemocnění není do jisté míry známá. Předpokládaly se vlivy jako chemické látky, záření, infekční etiologie (Litin et al. 2018). Obsáhlé studie však neprokázaly souvislost s vlivem zevních faktorů, jakou jsou ionizační záření apod. V patogenezi CLL byly identifikovány změny v chromozomálních oblastech, varianty v jediném nukleotidu, jednonukleotidové polymorfizmy. Velké množství důkazů týkajících se informací o genetické predispozici k CLL je založeno na epidemiologických i rodinných studiích (Strati et al. 2015).

Familiární forma CLL je popisována u 5–10 % případů. Jako familiární CLL se označuje CLL s nálezem alespoň 2 příbuzných prvního stupně s CLL. V některých genech byly identifikovány SNP, které jsou spojeny s familiární CLL (Strati et al. 2015).

U pacientů může být prokázán také abnormální karyotyp. K nejčastější chromozomové abnormitě u pacientů s CLL se řadí delece v oblasti dlouhého raménka chromozomu 13 (del 13q14, del – Deletion,

delece), delece v oblasti dlouhého raménka chromozomu 11 (del 11q22, del 11q23) nebo trizomie chromozomu 12 (American Society of Clinical Oncology 2018).

Delece 13q se vyskytuje přibližně u 50 % pacientů. Pro jedince s abnormitou 13q14 je charakteristický poměrně stabilní průběh onemocnění s nepříliš progresivní lymfocytózou, příznivou prognózou.

Druhou běžnou chromozomální abnormalitou u pacientů s CLL je delece v oblasti chromozomu 11q (del 11q). Delece v oblasti chromozomu 11q byla identifikována přibližně u 15 % případů. Delece v této oblasti vede k defektu tumor supresorového genu ATM (Ataxia teangiectasia mutated gene), který kóduje fosfatidylinositol-3-kinázu, což je enzym, který je za normálních okolností součástí regulace signální dráhy pro apoptózu, proliferaci, buněčný růst a metabolismus buněk (Kikushige 2020).

Trizomie chromozomu 12 je přítomna asi u 10–20 % pacientů s onemocněním CLL (Puiggros et al. 2014), je spojována s atypickou variantou CLL (klonální B-lymfocyty v rámci diferenciální diagnostiky odlišené od jiných lymfoproliferací, tj. s imunofenotypem CD19+ CD20+ CD200+ CD5- nebo CD23-) a spíše progresivním chováním nemoci (Urbaniak and Iskierka-Jażdżewska et al. 2022).

Další chromozomální abnormitou je delece části krátkého raménka chromozomu 17, která se spojena s výraznou progresí onemocnění. Konkrétně del 17q13 je spojena se ztrátou funkce tumor supresorového genu TP53 (Tumor protein 53), který kóduje protein p53. Mutace v genu TP53 má za následek pozměněnou funkci proteinu p53, který za normálních okolností hraje velmi důležitou roli při regulaci buněčného cyklu. Uvedené změny v karyotypu nemusí být vždy prokazatelné konvenčním barvením chromozomů. Pro průkaz změn v karyotypu jedince lze použít citlivější metodu molekulární cytogenetiky, fluorescenční *in situ* hybridizaci (Puiggros et al. 2014).

Vyšetření uvedených chromozomálních aberací metodou FISH není součástí stanovení diagnózy, ale dle Doporučení české hematologické společnosti, České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně je vhodné jej využít v situacích, kdy je cílem zpřesnit u nemocného prognózu onemocnění CLL, a to zejména u pacientů s indikací intenzivní, cílené léčby (Smolej et al. 2021).

Až u 65 % případů CLL bývá prokázána nadměrná exprese protoonkogenu Bcl2 (supresor apoptózy). Nicméně u pacientů s CLL s nadměrnou expresí proteinu Bcl2 nejsou prokázány změny na chromozomech, které ke zvýšené expresi Bcl2 obvykle vedou, jako např. t (14;18, t – Translocation, translokace) (Cimmino et al. 2005). Za nadměrnou expresí proteinu bcl2 stojí delece v oblasti chromozomu 13q14. Toto místo je místem genů pro mikroRNA – miRNA15a, miRNA16-1. Jejich delece vede k nadměrné expresi Bcl2 (Abruzzo et al. 2018).

3.2.3 Genetická predispozice

Chronická lymfocytární leukémie z malých B-lymfocytů je hematologická malignita, u které je prokázána genetická predispozice (Lin et al. 2021).

Na základě populačních analýz, které následně zveřejnil Goldin et al. (2003), bylo popsáno u příbuzných prvního stupně o 8,5 % vyšší riziko CLL a o 1,9 % vyšší riziko ostatních non-Hodgkinových lymfomů (NHL) (Goldin et al. 2004).

Výsledky studie, kterou publikoval Sellick et al. (2007), poskytly důkaz o možném mendelovském typu dědičnosti. Byla prokázána asociace lokusu 2q21.2 na chromozomu 2, lokusu

6p22.1 na chromozomu 6 s CLL a na základě rodokmenové analýzy byl prokázán model shodný s autozomálně recesivním modelem dědičnosti. Dále byl při mapování prokázán dominantně segregující lokus 18q21.1 (Sellick et al. 2007).

Ve výše uvedené studii, která měla sloužit k identifikaci lokusů, které jsou v asociaci s CLL, se autoři zabývali rodokmeny 206 rodin z různých zemí (např. Velká Británie, Spojené státy americké, Norsko, Izrael, Nizozemsko, Austrálie). Diagnóza jedinců v rodinách byla stanovena na základě běžně používaných standardů, vycházejících z WHO klasifikace. Se souhlasem jedinců byl stanoven jejich genotyp ze vzorku periferní krve. Do první fáze studie bylo zahrnuto 105 rodin, do druhé 101 rodin. Genotypizace byla provedena jak u členů rodiny s CLL či jinou lymfoproliferací, tak u nepostížených osob.

V určitých oblastech chromozomů se ve zmíněné studii vyskytuje několik genů podílejících se na buněčné proliferaci, diferenciaci B buněk i apoptóze a byla prokázána jejich asociace s CLL (Sellick et al. 2007). Příkladem může být oblast identifikovaná na chromozomu 2 (2q21). Tato oblast zahrnuje gen chemokinového receptoru (CXCR4), jež je více exprimován na buňkách CLL a předpokládá se spojení s progresí onemocnění (Barretina et al. 2003). Výsledky studie naznačují, že k rozvoji CLL v rodinách přispívá více než 1 gen (Sellick et al. 2007).

3.2.4 Zdravotní komplikace u CLL

Komplikace u CLL v převážné většině souvisejí s nerovnováhou imunitního systému. Příčinou jsou kvalitativní i kvantitativní defekty buněčné i humorální složky imunity. Prakticky u všech pacientů s CLL je detekována snížená hladina imunoglobulinů, což může mít za následek zvýšenou dispozici k infekcím. U části pacientů je popisován výskyt autoimunitního onemocnění, nejčastěji autoimunitní hemolytické anémie (AIHA) či trombocytopenie imunitního charakteru. Izolovaná aplazie červené krevní řady či neutropenie autoimunitního charakteru jsou méně časté a stejně tak autoimunitní onemocnění jiného než hematologického původu jsou u pacientů s CLL vzácné (Dearden 2008). Kromě autoimunitního onemocnění u pacientů s CLL může za vznikem cytopenie a jejich klinických projevů stát infiltrace kostní dřeně nádorovými buňkami či suprese navozená léčbou (Brejcha 2015).

Častou komplikací u pacientů s CLL jsou nemoci infekční etiologie (Buggins et al. 2008). Až 80 % pacientů s CLL trpí infekcemi různého původu. Nejčastěji se jedná o bakteriální agens. Bakteriální infekce jsou výrazem imunodeficitu souvisejícího s CLL, virové či mykotické infekce se rozvíjejí spíše v důsledku podávané léčby (Brejcha 2015).

Kromě infekčních komplikací, jejichž vyšší frekvence je podmíněna komplexní poruchou imunitního systému, ať už v důsledku CLL nebo léčby, se můžeme u pacientů s CLL setkat s výskytem autoimunitního onemocnění, sekundárního maligního onemocnění i progresí samotné CLL (Dasanu et al. 2007). Infekce jsou u pacientů s CLL nejčastější příčinou úmrtí (Hamblin et al. 2008).

3.2.5 Deregulace imunitního systému

Nádorové buňky CLL produkují řadu cytokinů, a tím se přímo podílejí na funkčních změnách imunitního systému. Produkují zejména interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), tumor nekrotizující

faktor (TNF – Tumor necrosis factor) a transformační růstový faktor β (TGF- β – Transforming growth factor) (Buggins et al. 2008).

Funkce imunitního systému je zároveň narušená i případnou současně probíhající léčbou s cytotoxickými účinky, což vede ke snížení počtu buněčných elementů imunitního systému. V důsledku změněné funkce a sníženého počtu T-lymfocytů je defektní proces prezentace antigenu B-lymfocytům. Dále je u pacientů s CLL prokázána porušená aktivita NK buněk, které imunofenotypem odpovídají normálním NK buňkám, ale morfologicky se od normálních NK buněk liší. Pro tyto NK buňky je charakteristická ztráta azurofilních granul, a tak i jejich lytické funkce (Kay and Zarling 1984).

Změny se týkají také monocytů, u pacientů s CLL byly detekovány tzv. neklasické monocyty exprimující CD14+ CD16++. Ve studii od Maffei et al. (2013) byly monocyty analyzovány nejen průtokovou cytometrií, ale byla provedena i analýza genové exprese. Výsledky studie popisují u monocytů získaných od pacientů s CLL deregulaci genů podílejících se na fagocytóze. Buňky CD14+ CD16++ (neklasické monocyty) mají schopnost inhibovat proliferaci T-lymfocytů. Jedná se o další mechanismus imunosuprese. Dysfunkce imunitního systému vede k usnadnění progresu nádoru a přítomnost monocytů CD14+ 16++ může značit agresivnější formu CLL, a to i na podkladě chromozomálních aberací prokázaných metodou FISH, což je popisováno ve studii Maffei et al. (2013).

U pacientů s CLL je kromě mononukleárů také snižená funkce granulocytů (Itälä et al. 1996). Můžeme se setkat s funkční poruchou neutrofilů i kvantitativními změnami. Snížení absolutního počtu neutrofilů může nastat v důsledku infiltrace kostní dřeně nádorovými buňkami či léčby, tj. poléková neutropenie (Manukyan et al. 2017).

3.2.6 Lymfoproliferativní onemocnění a solidní tumory

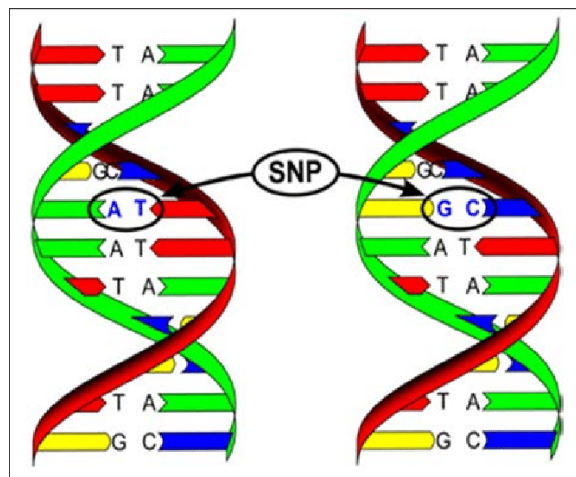
Pacienti s chronickou lymfatickou leukémií mají vyšší riziko rozvoje i dalších malignit. Příčinou rozvoje sekundární malignity může být porušená regulace imunitního systému, působení systémové léčby CLL i genetická predispozice (Beiggi et al. 2013). Dřívější retrospektivní kanadská studie (Manusow et al., 1975) poukázala na trojnásobně vyšší riziko rozvoje různých typů sekundární malignity u pacientů s CLL, u karcinomu kůže bylo prokázáno riziko dokonce osminásobné (Manusow and Weinerman 1975). Nicméně i další studie (Tsimberidou et al., 2009) podporují výsledky u zmíněné studie od Manusow et al. 1975 (Tsimberidou et al. 2009).

V další studii, tentokrát dánské, Schöllkopf et al. (2007) prokázal zvýšené riziko rozvoje sekundární malignity u pacientů s prokázanou CLL. Zde se zaměřovali na výskyt karcinomu plic u pacientů s dříve diagnostikovanou CLL. Vyšší riziko rozvoje karcinomu plic bylo prokázáno (Schöllkopf et al. 2007).

V pozdější nizozemské studii od van den Broek et al. 2014 bylo naopak prokázáno zvýšené riziko rozvoje CLL u pacientů s jinou primární malignitou. Tyto případy byly popsány u pacientů s karcinomem prostaty, kůže. Bylo zjištěno, že pacienti s diagnostikovaným karcinomem mají až o 90 % vyšší riziko rozvoje i hematologické malignity, konkrétně CLL. Ze zmíněné studie vyplývá, že by bylo vhodné se zaměřit na predisponující rizikové faktory (van den Broek et al. 2014).

4 Jednonukleotidový polymorfismus

Jaderný genom jedinců se vyznačuje určitou variabilitou. Genetický polymorfismus je definován jako změna v sekvenci DNA s frekvencí vyšší než 1 % v lidské populaci. Hovoříme-li o jednonukleotidovém polymorfismu, popisujeme místo jednonukleotidové změny. Může se jednat o substituci, tj. záměnu jednoho nukleotidu za druhý (Obrázek 10), méně často o inzerci či delecii. Jednonukleotidový polymorfismus je nejmenší možnou změnou v sekvenci DNA. V praxi to znamená existenci další varianty daného genu, tedy existenci minimálně dvou alel pro daný gen (Beránek 2016). SNP se v populaci vyskytují s různou frekvencí a jejich zastoupení se v jednotlivých populacích liší (Lan et al. 2010). Substitute nukleotidů má za následek změnu v sekvenci aminokyselin v bílkovinovém řetězci proteinu nebo může například vytvářet tzv. stop-kodon. Polymorfizmy mohou být detekovány v kódující nebo nekódující oblasti lidského genomu. Fenotypové rozdíly jedinců jsou podmíněny právě genetickou variabilitou (Beránek 2016).



Obrázek 10: Jednonukleotidový polymorfismus (Mitova et al. 2020)

V označeném místě je detekován polymorfismus, substitute adeninu guaninem. Pro dané místo existují tedy 2 dvě varianty nukleotidů (A – Adenine, adenin nebo G – Guanine, guanin).

4.1 SNP a onemocnění

SNP mohou být v asociaci s některými onemocněními. Mohou do určité míry napomoci predikci či diagnostice určité nemoci. Prostřednictvím statistického vyhodnocení lze prokázat asociaci SNP a nemoci tím, že prokážeme vyšší frekvenci dané konkrétní alely u jedinců s daným onemocněním (fenotypovým projevem) než u kontrolní skupiny jedinců, tj. jedinců bez dané nemoci (Risch and Merikangas 1996).

Jednonukleotidové polymorfizmy i spolu s dalšími faktory jsou příčinou celé škály onemocnění, jako jsou například trombofilní stavy (mutace faktor V Leiden), hemoglobinopatie (srpkovitá anémie), cystická fibróza (Penka et al. 2011).

Výskyt jednotlivých polymorfizmů v lidském genomu mapují genomové studie (GWAS – Genome-wide association study), které se zároveň snaží najít a určit genetickou významnost asociace

mezi konkrétním polymorfizmem a onemocněním (Lan et al. 2010). Své využití si detekce SNP v genech našla také ve farmakogenetice, kdy polymorfismus v daném genu může mít vliv na farmakokinetiku či farmakodynamiku podávaného léčiva. Příkladem z praxe je genotypizace kódující oblasti genu TPMT (thiopurin-S-methyltransferáza) a stanovení metabolické aktivity (fenotypizace) enzymu TPMT, čímž lze individualizovat dávky thiopurinových léčiv, na jejichž biodegradaci se právě thiopurin-S-methyltransferáza podílí (Demlová et al. 2014). Podobně bylo do praxe zavedeno vyšetření genotypizace genu pro DPYD (dihydropyrimidin dehydrogenáza) u onkologických pacientů léčených 5-fluorouracilem (5-FU) (Pilátová et al. 2013).

4.1.1 SNP spojené s rizikem CLL

Některé SNP jsou v asociaci právě s hematologickými malignitami nebo přímo s CLL. Různé studie prokázaly genetickou predispozici nejen k CLL, ale i jiným lymfoproliferacím i Hodgkinovu lymfomu. Prostřednictvím genomové asociační studie bylo identifikováno několik lokusů spojených s rizikem CLL (Zemanová et al. 2019).

První GWAS zaměřená na identifikaci SNP spojených s CLL byla provedena v r. 2008 (505 případů CLL, 14389 kontrol). Na chromozomech bylo identifikováno 6 lokusů spojených s rizikem CLL (2q13, 2q37.1, 6p25, 11q24, 15q23 a 19q13). Celkem bylo genotypováno 299 983 SNP. Další studie potvrdily asociaci 5 lokusů. Některé studie nepotvrdily asociaci lokusu 19q13 s CLL. Další navazující analýza na prvotní GWAS identifikovala na chromozomech dalších 5 lokusů (2q37.3, 8q24.21, 15q25.2, 15q21.3 a 16q24.1), které jsou spojeny s rizikem CLL (Slager et al. 2013).

V rámci druhé GWAS (148 případů CLL, 592 kontrol) nebyly identifikovány žádné nové lokusy na chromozomech, které by vykazovaly zvýšené riziko CLL, ale byly potvrzeny některé z předešlých identifikovaných (např. 11q24). Pomocí druhé GWAS bylo úspěšně genotypováno 339 528 SNP. Třetí GWAS zaměřená na identifikaci SNP spojených s CLL zahrnovala 407 případů CLL a 296 kontrol evropského původu a bylo úspěšně genotypováno 827 777 SNP (Slager et al. 2013).

Další GWAS zahrnovala třístupňovou studii 3100 případů CLL a 7667 kontrol z 26 mezinárodních studií. Byly objeveny další SNP na několika nových lokusech (18q21.33, 11p15.5, 4q25, 2q33.1, 9p21.3, 18q21.32, 15q15.1 a 2p22.2). Část těchto lokusů se nachází v genech, které se podílí na regulaci apoptózy (Slager et al. 2013).

5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda, která umožňuje rychlou simultánní multiparametrickou analýzu. V buněčné suspenzi je možné pomocí průtokového cytometru určit imunofenotyp i kvantitu buněk. Průtoková cytometrie má své uplatnění zejména v oblasti diagnostiky onemocnění hematologického, onkologického i imunologického. V hematookologii je nedílnou součástí diagnostiky a diferenciální diagnostiky leukemií a lymfomů (Klabusay and Winkler 2011).

5.1 Princip průtokové cytometrie

Při měření průtokovým cytometrem je možné buňky identifikovat a kvantifikovat. Buněčná suspenze je unášena proudem nosné kapaliny a v určitém bodě po setkání s paprskem světla dochází na částicích/buňkách k rozptylu světla v různých úhlech, což umožní rozlišit vlastnosti buněk, jako je jejich velikost či vnitřní komplexnost.

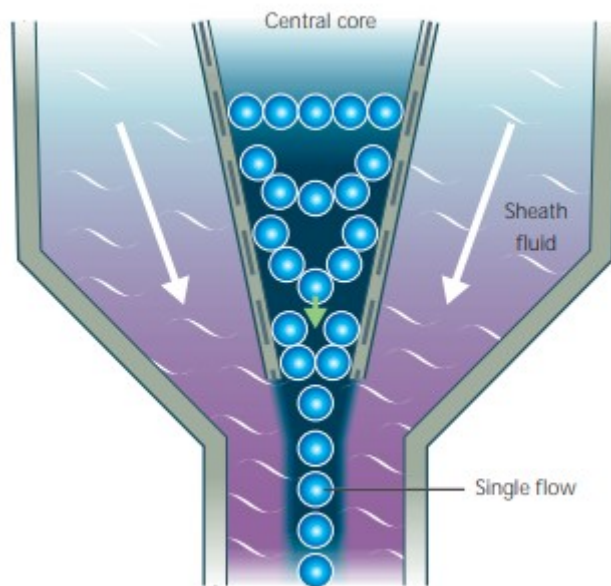
- Forward scatter (přímý rozptyl) – rozptyl laserového paprsku v malém úhlu, poskytuje informaci o velikosti částice.
- Side scatter (boční rozptyl) – rozptyl laserového paprsku pod úhlem 90° , poskytuje informace o komplexitě částice.

Další kvalitativní i kvantitativní informace o částicích poskytuje intenzita emitovaného fluorescenčního záření použitého fluorochromu, který je součástí buněčné suspenze. Fluorochromem konjugované monoklonální protilátky se vážou na konkrétní struktury částice a po setkání s laserovým paprskem dochází k excitaci fluorochromu a následné emisi záření. Emitované fluorescenční záření je v přístroji detekováno a zpracováno (Brown and Wittwer 2000).

5.2 Instrumentace

Průtokový cytometr tvoří 3 základní systémy: fluidní, optický a elektronický (Ormerod 1994).

Fluidní systém je tvořen centrálním kanálem, kterým prochází vzorek. Centrální kanál je umístěn v komoře, kterou pod tlakem prochází nosná kapalina (sheath fluid), což vede k hydrodynamické fokusaci částic (Obrázek 11). Částice vzorku jsou seřazeny do proudu částic tak, aby mohly být analyzovány (Rahman 2016).



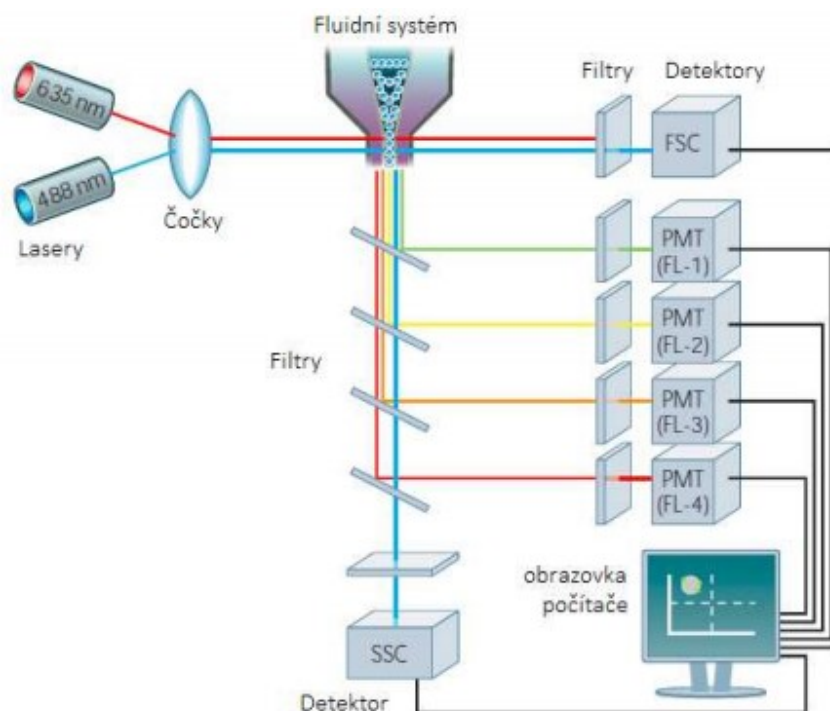
Obrázek 11: Fluidní systém (Rahman 2016)

Optický systém (Obrázek 12) tvoří **lasery** (zdroj světla) a sběrná část, kam patří **systém čoček, zrcadel a optických filtrů**, které zachycují fluorescenční záření emitované fluorochromem po projití částice laserovým paprskem. Fluorochrom navázaný na monoklonální/polyklonální protilátce je po vazbě na částice a projití částice laserovým paprskem excitován a fotony emitované fluorochromem jsou detekovány optickým systémem přístroje. Optické čočky soustřeďují fotony emitovaného záření na sadu zrcadel a filtrů, které usměřují a odrážejí světlo různých vlnových délek do konkrétních fluorescenčních kanálů. Některé filtry propouštějí světlo o delší vlnové délce a světlo o kratší vlnové délce odrazí do jiného detektoru (McKinnon 2018).

Průtokový cytometr může být vybaven více lasery. Průtokový cytometr, který je standardně používaný pro měření dat na Oddělení laboratorní medicíny Masarykova onkologického ústavu v Brně, disponuje třemi lasery a umožňuje detekovat současně až 10 znaků:

- modrý – operuje při vlnové délce 488 nm,
- červený – při vlnové délce 638 nm,
- fialový – při vlnové délce 405 nm (Beckman Coulter – Instruction For Use 2021).

Mezi nejčastěji používané fluorochromy patří například fluorescein isothiokyanát (FITC), phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC). Pro každý fluorochrom je specifická jeho excitační a emisní vlnová délka (McKinnon 2018).



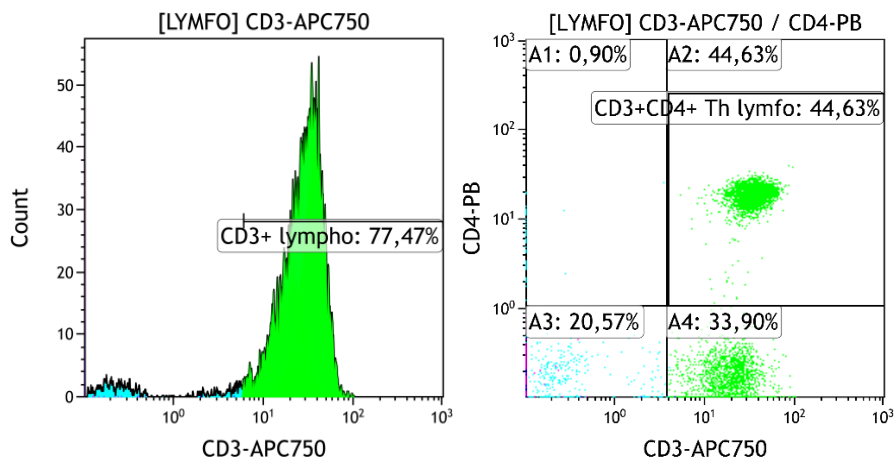
Obrázek 12: Optický systém průtokového cytometru (Rahman 2016)

Zdrojem světla v průtokovém cytometru jsou lasery a do sběrné části optického systému patří systém čoček, zrcadel a optických filtrů (levá část část). V pravé části obrázku je detekční systém, který je představován několika detektory (počet se liší konkrétním typem průtokového cytometru).

Detekční systém je představován **detektory**, které převádějí světelný signál na elektrický. Počet detektorů se liší v závislosti na typu průtokového cytometru. Mohou být použity dva typy detektorů: fotodiody a fotonásobiče. Fotodiody se využívají pro detekci silnějšího signálu. Fotonásobiče převádí světelnou energii na elektrický proud a generují napěťové pulzní signály. Jsou citlivějšími detektory vhodnými pro detekci emitovaného fluorescenčního záření (Shapiro 2013).

Některé napěťové pulzy musejí být zesíleny tak, aby mohly být popsány charakteristiky buněk. Signál napěťového pulzu je lineárně nebo logaritmicky upraven a prostřednictvím ADC převodníku (ADC – Analog to Digital Converter, analogově digitální převodník) je signál digitalizován. Výsledkem je grafické zobrazení na obrazovce počítače (Shapiro 2013).

Analýza dat je prováděna pomocí grafických a číselných údajů. Grafickým výstupem analýzy průtokovým cytometrem mohou být jednoparametrové histogramy nebo dvouparametrové scattergramy (Obrázek 13). V histogramu je na ose x zachycena intenzita fluorescence a na ose y počet částic. Dvouparametrové scattergramy, bodové grafy (dot plot), umožňují vizualizaci různých parametrů na ose x, y a jejich vyobrazení v podobě tečky. Pomocí tzv. gatování lze oddělit jednotlivé populace buněk (Ormerod 2000).



Obrázek 13: Histogram vs. scattergram, software Kaluza Analysis 2.1

V levé části obrázku je jednoparametrový histogram, identifikovaná populace jsou CD3+ T-lymfocyty (osa x znak CD3, použitým fluorochromem je APC750). V pravé části obrázku je dvouparametrový scattergram, v kvadrantu A2 je populace pomocných T-lymfocytů CD3+ CD4+ (osa y znak CD4, použitým fluorochromem je PB; osa x znak CD3, použitým fluorochromem je APC750).

6 Real-time PCR

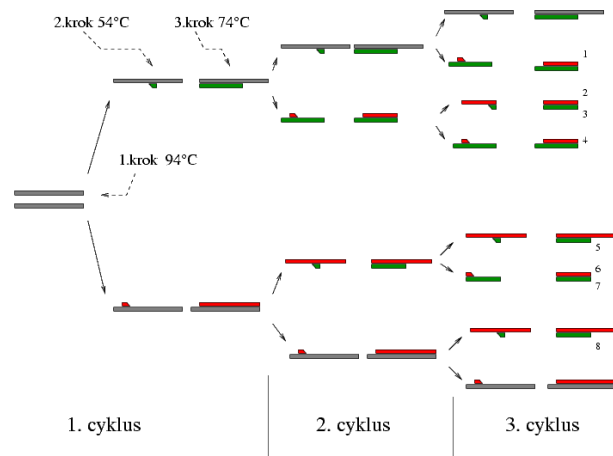
Polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase chain reaction, Obrázek 14) je metoda rychlé a snadné amplifikace vybraného úseku DNA. Úsek DNA, který má být amplifikován je ohraničen primery (oligonukleotidy DNA) a k syntéze nového vlákna DNA se využívá termostabilní DNA polymeráza (Maddocks et al. 2016).

6.1 Princip real-time PCR

Principem PCR je amplifikace vybraného úseku DNA. Templátová DNA je v prvním kroku denaturována (denaturace při teplotě 95 °C) a vlákna DNA se rozvolňují, následuje hybridizace (dosednutí primerů při teplotě 50–60 °C), při které se krátké úseky DNA (primery) vážou na základě komplementarity bazí k cílové sekvenci analyzované DNA, v posledním kroku dochází k elongaci nového řetězce (syntéza nového řetězce při teplotě 65–75 °C). Tento cyklus se opakuje a množství přesných kopií DNA exponenciálně roste (Maddocks et al. 2016).

Real-time PCR umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. V reálném čase dochází k amplifikaci DNA a detekci fluorescenčního signálu, který je v průběhu reakce zaznamenáván. Pro detekci PCR produktu lze využít značené hybridizační sondy (SYBR Green assays) nebo dvojitě značené hydrolyzační sondy (TaqMan). TaqMan sondy jsou komplementární k cílové sekvenci DNA a jsou velice často využívány. V principu se jedná o navázání vybrané sekvence DNA a oligonukleotidu, který je na 5' konci značený tzv. zářičem (reporter, reporter dye) a na 3' konci tzv. zhášečem (quencher, quencher dye). Během reakce se sonda na základě komplementarity bazí váže mezi pár primerů, tj. přední (forward primer) a zadní (reverse primer). Po navázání oligonukleotidu (sondy) na templátovou DNA je sonda hydrolyzována 5' exonukleázovou aktivitou Taq polymerázy, tím dochází k separaci zhášeče od zářiče. Poté ze zářiče v podobě fluorochromu dochází k emisi fluorescenčního záření. Pokud sonda není činností Taq polymerázy hydrolyzována, k fluorescenci nedochází (zářič i zhášeč jsou vázány na molekulu oligonukleotidu). Analýza probíhá v cyklech a s přibývajícím množstvím PCR produktu dochází i k postupnému zvyšování intenzity fluorescenčního záření (Biassoni et al. 2020).

Aplikací metody real-time PCR v praxi může být detekce SNP. Cílem je rozlišit jednotlivé nukleotidové varianty v sekvenci vyšetřovaného úseku DNA. Pro získání dat k publikaci této práce jsem využila právě metodu molekulární genetiky, která je dnes již standardem laboratorní molekulární diagnostiky, real-time PCR (Matsuda et al. 2017).



Obrázek 14: Princip PCR (Martin Dlouhý – Robotika 2005)

7 Cíle diplomové práce

- 1) Provést imunofenotypizaci lymfocytů periferní krve u jedinců účastnících se preventivního programu MOÚ a pacientů se solidním nádorem.
 - Kategorizovat výsledky vyšetření na normální imunofenotyp B-buněk a imunofenotyp B-buněk odpovídající klonálním B-lymfocytům.
 - Na základě imunofenotypu klonálních B-lymfocytů určit typ lymfoproliferativního onemocnění.
 - Zhodnotit výskyt klonální expanze B-lymfocytů v závislosti na rizikových faktorech (pohlaví, věk, výskyt sekundární malignity).
 - Zhodnotit progresi asymptomatického stavu (MBL) do CLL.

- 2) Popsat etiopatogenezi onemocnění CLL.
 - Na základě literatury vybraných jednonukleotidových polymorfizmů provést genotypizaci v kontrolní skupině a skupině s onemocněním CLL nebo MBL.
 - Vyhodnotit zastoupení rizikových alel, genotypů u vyšetřovaných osob.
 - Zhodnotit asociaci testovaných SNP s diagnózou CLL a MBL se zaměřením na pacienty současně s diagnózou solidního tumoru.
 - Porovnat výsledky vyšetřovaných polymorfizmů s jinými studii.

8 Materiál a metody

Biologický materiál

Identifikace imunofenotypu lymfocytů periferní krve byla provedena z venózní krve odebrané do antikoagulačního činidla K₃EDTA (Sarstedt Monovette, 2,7 ml).

Izolace a genotypizace DNA byla u části pacientů provedena ze vzorku venózní krve odebrané do antikoagulačního činidla K₃EDTA (Sarstedt Monovette, 2,7 ml) a u části pacientů bylo pro izolaci DNA a následnou genotypizaci SNP použité sérum získané z odběru venózní krve do zkumavky bez antikoagulačního činidla (Neutral Sarstedt Monovette, 7,5 ml), které je standardně u pacientů Masarykova onkologického ústavu v Brně archivováno v bance biologického materiálu (BBMRI – Biobanks and Biomolecular Resources Research Infrastructure).

BBMRI je Banka klinických vzorků, kde uložený biologický materiál je katalogizován a může být využitý pro budoucí výzkum.

Informovaný souhlas s molekulárně genetickým vyšetřením je uložen v dokumentaci pacienta.

Chemikálie pro imunofenotypizaci lymfocytů:

- Monoklonální/polyklonální fluorochromem konjugované protilátky (Ab) (Beckman Coulter),
- Flow-Check Pro (Beckman Coulter),
- Immuno-Trol Cells (Beckman Coulter),
- VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter),
- PBS buffer (Beckman Coulter),
- IsoFlow Sheath Fluid (Beckman Coulter).

Chemikálie pro molekulární diagnostiku:

- MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche)
- FS Enzyme HybProbe; 1a (Roche)
- FS Reaction Mix HybProbe; 1b (Roche)
- H₂O, PCR grade HybProbe (Roche)
- LightSNiP rs17483466 (TIB MolBiol)
- LightSNiP rs735665 (TIB MolBiol)
- LightSNiP rs872071 (TIB MolBiol)
- LightSNiP rs13397985 (TIB MolBiol)
- LightSNiP rs7176508 (TIB MolBiol)

Přístroje pro imunofenotypizaci lymfocytů:

- Laboratorní centrifuga UNIVERSAL 320 (Hettich)
- Průtokový cytometr Navios EX (Beckman Coulter)

Přístroje pro molekulární diagnostiku:

- LightCycler 480 (Roche),

- Magna Pure Compact (Roche),
- Laminární box (CleanAir, Schoeller Instruments),
- Laboratorní centrifuga na mikrotitrační destičky (BIOSAN LMC-3000),
- Cooling/Heating Block – CHB 202 (BIOER),
- Mini centrifuga MPV-15 (MPV Medical Instruments).

8.1 Imunofenotypizace lymfocytů

Imunofenotypizace leukocytů byla provedena pomocí průtokového cytometru po inkubaci periferní krve pacienta se směsí fluorochromem konjugovaných monoklonálních protilátek. Byly identifikovány jednotlivé leukocytární subpopulace a dále analyzovány – určení imunofenotypu a klonality B-lymfocytů.

8.1.1 Denní kontrola kvality

Každý den se před měřením klinických vzorků pacientů provádí měření pro vyhodnocení interní kontroly kvality, které se skládají z měření:

- Flow-Check Pro,
- Immuno-Trol Cells.

Flow-Check Pro je suspenze fluorescenčních částic, která slouží pro ověření správnosti nastavení optiky a kontrolu kontinuálního průtoku kapaliny systémem hadiček cytometru při měření. Immuno-Trol Cells je suspenze zastoupená dvěma typy stabilizovaných lidských buněčných komponent, leukocyty a erytrocyty. Leukocyty mají na svém povrchu antigeny s deklarovanou mírou exprese (od výrobce), které jsou inkubovány s příslušnými monoklonálními protilátkami. Příprava vzorku pro interní kontrolu kvality probíhá stejně jako standardní zpracování vzorku pro měření v průtokovém cytometru.

8.1.2 Fluorochromem konjugované protilátky

Identifikace fenotypu lymfocytů spočívá v navázání fluorochromem konjugované monoklonální protilátky na antigen exprimovaný na membráně příslušné populace buněk. Pro imunofenotypizaci lymfocytů byl použitý panel komerčně dodávaných fluorochromem značených monoklonálních/polyklonálních protilátek.

Měřené membránové markery buněk u buněk CLL:

- CD45 – je membránový glykoprotein exprimovaný na všech leukocytech (Beckman Coulter – CD45-Krome Orange 2021).
- CD19 – je membránový glykoprotein typu I exprimovaný na všech normálních B-lymfocytech (Beckman Coulter – CD19-FITC 2021).
- CD79b – je molekula exprimovaná na povrchu B-lymfocytů (Beckman Coulter – CD79b-PE 2021).

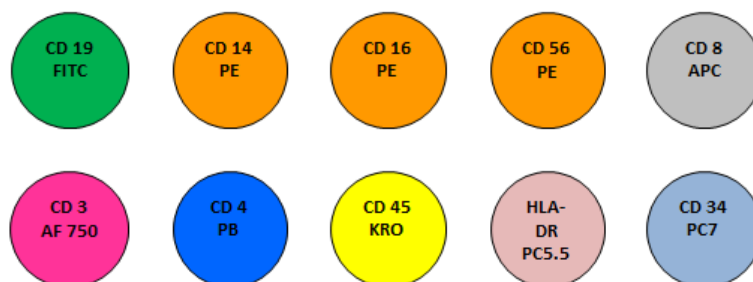
- FMC7 – je transmembránový glykoprotein exprimovaný populací B-lymfocytů (Beckman Coulter – Anti-FMC7-FITC 2021).
- CD5 – je transmembránový glykoprotein typu I exprimovaný na povrchu zralých T-lymfocytů, subpopulaci B-lymfocytů proliferující v rámci lymfoproliferativního onemocnění (Beckman Coulter – CD5-Pacific Blue 2019).
- CD23 – je transmembránový glykoprotein primárně exprimovaný na B-lymfocytech a monocytech, dále může být přítomný na T-lymfocytech, eozinofilech (Beckman Coulter – CD23-APC 2020).
- CD200 – je membránový glykoprotein exprimovaný na aktivovaných T a B lymfocytech (Beckman Coulter – CD200-APC-Alexa Fluor 750 2019).
- Kappa – je lehký polypeptidový řetězec imunoglobulinu exprimovaný na povrchu zralých B-lymfocytů v periferní krvi (Beckman Coulter – Anti-Kappa-FITC 2021).
- Lambda – je lehký řetězec imunoglobulinu exprimovaný na povrchu zralých B-lymfocytů v periferní krvi (Beckman Coulter – Anti-Lambda-PE 2021).
- CD20 – je membránový protein. Exprese znaku CD20 je omezena buňky B-buněčné linie a klesá při terminální diferenciaci na plazmatické buňky (Beckman Coulter – CD20-APC-Alexa Fluor 750 2021).

8.1.3 Příprava směsi monoklonálních protilátek

Pro stanovení imunofenotypu buněk v periferní krvi používáme na OLM MOÚ směsi monoklonálních/polyklonálních protilátek.

V případě, že fluorochromem je FITC nebo PE, je jeho objem pipetovaný do zkumavky dvakrát vyšší než u ostatních fluorochromů. Pro jeden test je podle příbalového letáku vhodné použít u protilátek konjugovaných fluorochromem FITC a PE 20 µl, u ostatních fluorochromem konjugovaných monoklonálních/polyklonálních protilátek je to 10 µl na test / 100 µl periferní krve.

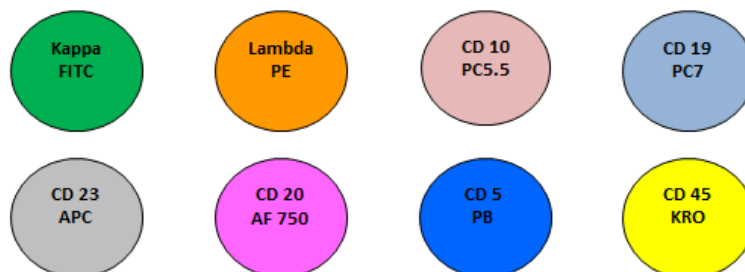
Panel měřených znaků „TBNK“ (Obrázek 15): směs fluorochromem značených monoklonálních protilátek ve zkumavce označované TBNK slouží pro základní rozlišení populací leukocytů, tj. T a B lymfocytů, NK buněk.



Obrázek 15: Směs monoklonálních protilátek používaných v panelu TBNK

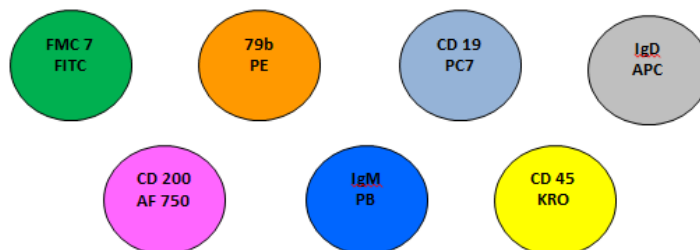
Obrázek znázorňuje fluorochromem konjugované protilátky používané na Oddělení laboratorní medicíny Masarykova onkologického ústavu pro detekci znaků buněk označovaných v panelu měření jako TBNK.

Panel měřených znaků „B-panel“ (Obrázek 16, Obrázek 17): směs fluorochromem značených monoklonálních/polyklonálních protilátek kombinovaných v protokolu označovaném CLL1 a CLL2 pro detekci povrchových znaků typických pro buňky CLL. Pro určení klonality B-lymfocytů jsou v protokolu analyzovány také povrchové řetězce kappa/lambda.



Obrázek 16: Směs monoklonálních protilátek používaných v protokolu CLL1.

Směs fluorochromem značených monoklonálních/polyklonálních protilátek v protokolu CLL1 slouží pro detekci antigenů exprimovaných na povrchu nádorových B-lymfocytů.



Obrázek 17: Směs monoklonálních protilátek používaných v protokolu CLL2

Směs fluorochromem značených monoklonálních protilátek v protokolu CLL2 slouží pro identifikaci některých dalších antigenů exprimovaných na povrchu nádorových B-lymfocytů.

8.1.4 Příprava vzorku pro analýzu

Pro identifikaci imunofenotypu leukocytů jsou na OLM MOÚ nastavené panely pro měření. Mezi jednotlivými pipetovacími kroky se vzorek vířivě míchá.

V prvním kroku se pipetuje do polypropylenové zkumavky (12 × 75 mm) směs protilátek, následně se přidá periferní krev (PK) a v druhém kroku použitím VersaLyse Lysing Solution dojde k lýze erytrocytů a následně použitím PBS pufru (PBS – Phosphate-Buffered Saline, fosfátem pufovaný fyziologický roztok) k odmytí nenávaných protilátek.

Před analýzou povrchových lehkých řetězců imunoglobulinu (kappa, lambda) se vzorek periferní krve 3× promyje opakovanou centrifugací, odsátím supernatantu a doplněním IsoFlow Sheath Fluid do ¾ zkumavky. Promytí vzorku periferní krve je stěžejní pro odstranění volných lehkých řetězců kappa/lambda.

Pipetovací protokol TBNK:

70 µl směsi Ab + 50 µl PK
Inkubace 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
500 µl VersaLyse Lysing Solution
Inkubace 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
2 ml PBS
Centrifugace (500 g, 5 min, 20 °C)
Odstranění supernatantu.
500 µl PBS

Pipetovací protokol CLL1:

50 µl směsi Ab + 50 µl 3× promyté PK
Inkubace 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
500 µl VersaLyse Lysing Solution
Inkubace 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
2 ml PBS
Centrifugace (500 g, 5 min, 20 °C)
Odstranění supernatantu.
500 µl PBS

Pipetovací protokol CLL2:

45 µl směsi Ab + 50 µl 3× promyté PK
Inkubace 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
150 µl VersaLyse Lysing Solution
Inkubace 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
2 ml PBS
Centrifugace (500 g, 5 min, 20 °C)
Odstranění supernatantu.
500 µl PBS

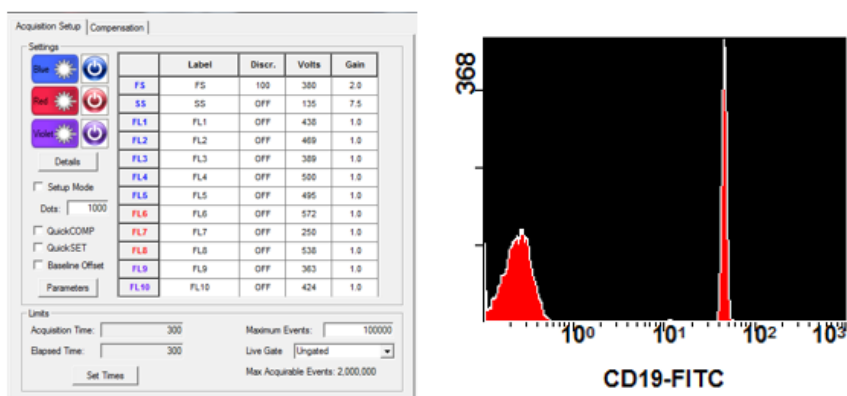
8.1.5 Analýza průtokovým cytometrem Navios EX

V okně Acquisition Manager je zobrazený seznam protokolů, které mají být u jednotlivých zkumavek analyzovány. Pořadí protokolů odráží řazení zkumavek umístěných v karuseli průtokového cytometru.

U samotné analýzy je možné si nastavit kritérium, jehož dosažením je analýza ukončena. Na Oddělení laboratorní medicíny je pro výše zmíněné panely měření nastavené kritérium pro počet 20 000 analyzovaných událostí z jedné zkumavky v tzv. lympho gate (gate ohraničující populaci lymfocytů).

8.1.6 Nastavení průtokového cytometru Navios EX Beckman Coulter

Pro správné nastavení průtokového cytometru je stěžejní nastavení napětí (voltů), zesílení a kompenzace. Nastavení napětí (Obrázek 18) a zesílení detektoru se používá k určení polohy signálu pro každý parametr. K tomuto účelu se při nastavení průtokového cytometru Navios EX využívá set – fluorescenční částice Flow-Set Pro od firmy Beckman Coulter. Tento set sestává z negativního a pozitivního kontrolního materiálu. Díky úpravě napětí pro konkrétní detektor je možné pík kontrolního materiálu posunout do požadované pozice (Obrázek 18), resp. odlišit pík negativního a pozitivního vzorku. Po nastavení napětí, odlišení pozitivní populace od negativní, užitím komerčně dodávaných fluorescenčních částic se pro vícebarevnou analýzu provádí kompenzace jednotlivých fluorochromů (Obrázek 19). Při použití více fluorochromů během jedné analýzy může dojít k překrývání jejich emisních spekter, proto je nutné jejich vzájemný překryv eliminovat. Eliminace vychází z tzv. kompenzace fluorochromů, tedy odečtení procentuálního zastoupení fluorescenčního signálu detekovaného jedním detektorem od fluorescenčního signálu detekovaného jiným detektorem. Tím se koriguje překryv jednotlivých emisních spekter fluorochromů. Každý detektor je určený pro snímání jiné vlnové délky specifické pro daný fluorochrom (Beckman Coulter – Instruction For Use 2021).



Obrázek 18: Nastavení napětí pomocí Flow-Set Pro, Průtokový cytometr Navios EX (Beckman Coulter)

Na levé straně obrázku je zobrazeno nastavení detektorů. V záložce Acquisition Setup je možné upravit napětí (Volts) pro konkrétní detektor. Na pravé straně obrázku je zobrazena míra fluorescence u použitého fluorochromu, v tomto případě FITC.

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
FL1		1.4	0.0	0.4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7
FL2	11.9		0.0	4.1	14.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
FL3	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL4	0.2	3.6	0.0		0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL5	0.0	0.0	0.0	12.2		0.0	0.0	0.6	0.0	0.0
FL6	0.0	0.0	0.0	3.9	0.3		0.0	33.7	0.0	0.0
FL7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0
FL8	0.0	0.0	0.0	6.8	13.3	3.5	0.0		0.0	0.0
FL9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0		1.0
FL10	1.5	2.4	0.0	0.1	0.4	0.0	0.0	0.0	18.4	

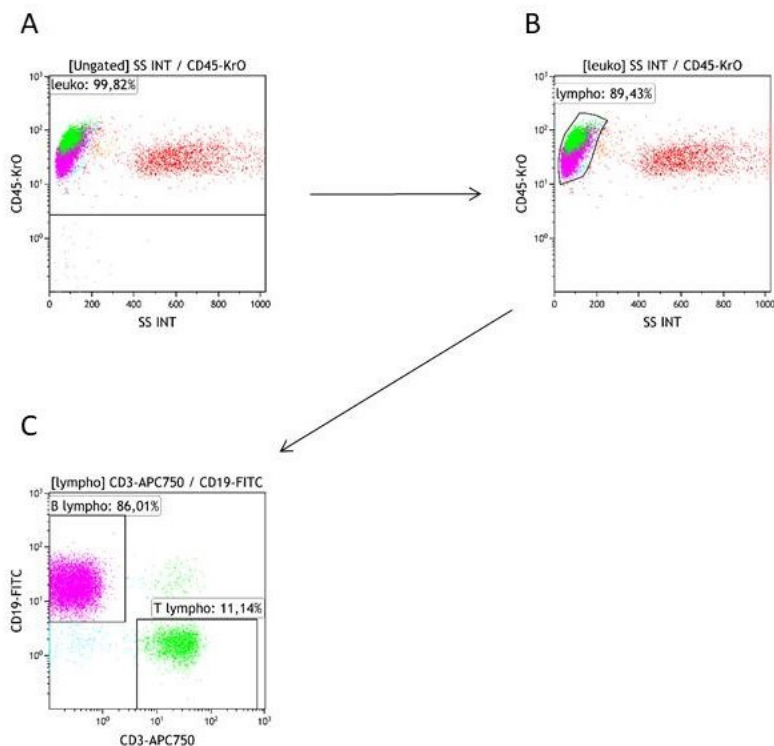
Select the column which contains the Fluorochrome creating spectral overlap in the FMT (row).

Obrázek 19: Kompenzační matice, Průtokový cytometr Navios EX Beckman Coulter.

Velikost kompenzační matice odpovídá počtu fluorescenčních detektorů. Průtokový cytometr Navios EX od firmy Beckman Coulter používaný na Oddělení laboratorní medicíny Masarykova onkologického ústavu v Brně disponuje možností využití až 10 barev, matice se 100 hodnotami.

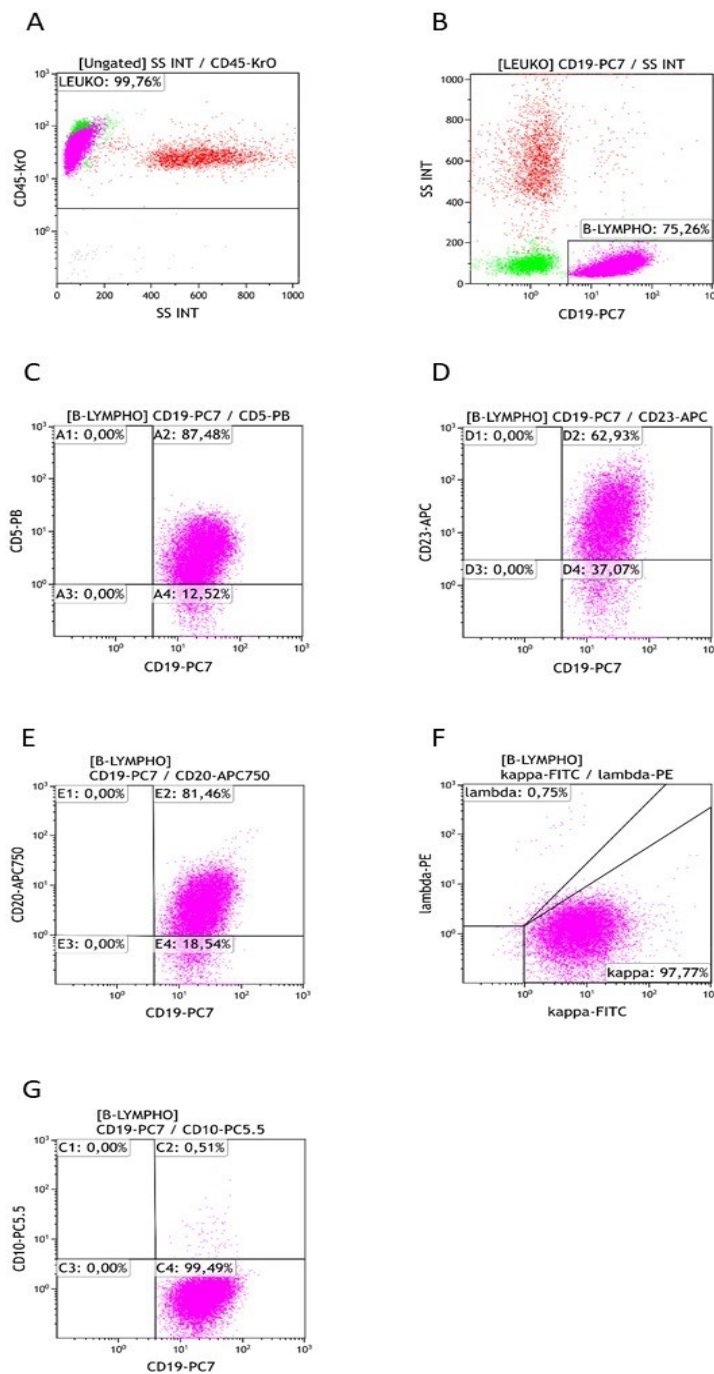
8.1.7 Strategie určení imunofenotypu buněk

Pro zjištění zastoupení jednotlivých populací lymfocytů používáme na OLM MOÚ tzv. TBNK panel (Obrázek 20). Následně v případě zvýšeného procentuálního zastoupení B-lymfocytů provádíme určení/vyloučení klonality lymfocytů, tzv. B-panel, který je tvořen 2 protokoly s názvem CLL1 (Obrázek 21) a CLL2 (Obrázek 22). Vhodnou kombinací fluorochromem značených protilátek tak určíme imunofenotyp B-lymfocytů. Panel s názvem CLL1 je určen pro detekci antigenů na povrchu buněk typických pro buňky CLL (CD19+ CD5+ CD23+ a snížená exprese znaku CD20). Dále je možná identifikace buněk jiných lymfoproliferací, jako např. folikulárního lymfomu (typická je exprese znaku CD10, CD38), vlasatobuněčné leukémie (buňky CD19+ CD5- CD23-), kterým může zjištěný imunofenotyp buněk odpovídat. Kromě CLL je znak CD5 typicky exprimovaný na povrchu buněk lymfomu z plášťových buněk. Při pozitivitě znaku CD5 je možné provedením analýzy dalších antigenů (panel CLL2) odlišit jiné tzv. CD5+ lymfoproliferativní onemocnění od buněk CLL. Vhodné je zařazení dalších znaků, jako např. FMC7 (snížená exprese u buněk CLL), 79b (snížená exprese u buněk CLL), CD200 (buňky CLL typicky exprimují znak CD200+, zatímco u buněk MCL typicky není patrná exprese znaku CD200). Těžké řetězce imunoglobulinů (IgD, IgM) mohou být na buňkách lymfoproliferativního onemocnění exprimovány s různou intenzitou. Pro buňky CLL je typická jejich snížená exprese (Kačírková et al. 2007).



Obrázek 20: Strategie určení základního imunofenotypu lymfocytů – panel TBNK

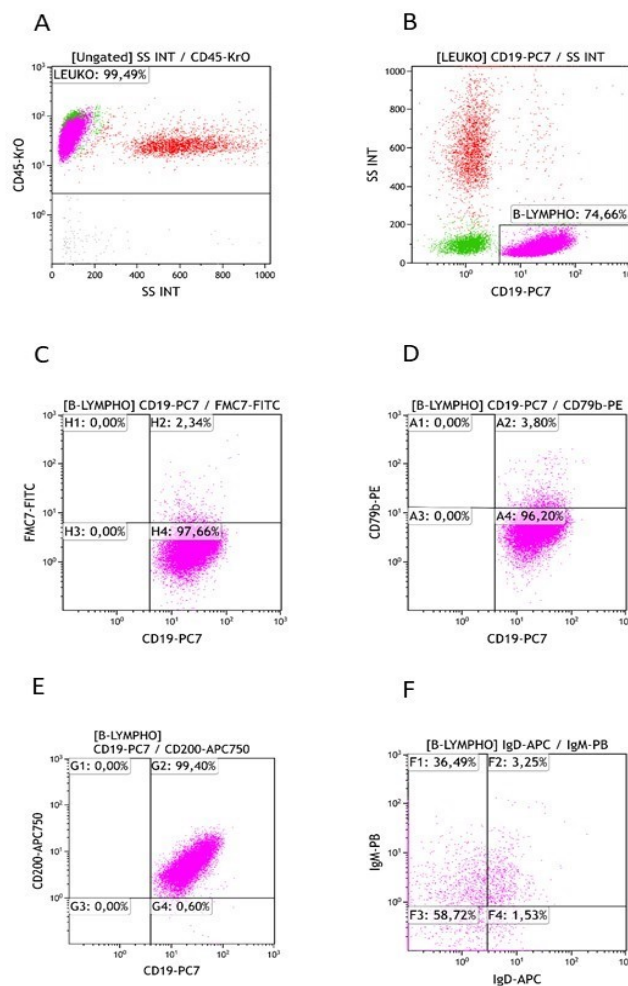
Na obrázku v části označené jako A jsou na ose x rozděleny buňky úměrně granularitě buněk (side scatter), osa y je označená jako CD45-KrO a v této úrovni jsou tedy vyobrazeny buňky exprimující znak CD45 (hematopoetické buňky). Umístěním gate označeného jako leuko dojde k oddělení buněk CD45+ a CD45-. V některých případech je na uvedeném scattergramu také možné vidět populaci buněk CD45^{low} (prekurzorové buňky). Pro detekci znaku CD45 je použita fluorochromem Krome Orange (KrO) značená monoklonální protilátka. Na obrázku v části označené jako B jsou na ose x také rozdělené buňky podle granularity buněk (side scatter). Osa y je označená jako CD45-KrO a v této úrovni jsou tedy vyobrazeny buňky exprimující znak CD45. Buňky, které vidíme v celé části B obrázku, jsou gatovány pouze z gate leuko. Na části obrázku označené jako C jsou buňky uspořádány do populací B- a T-lymfocytů podle jejich exprese povrchového znaku CD19 (osa y, použitý fluorochrom FITC) a CD3 (osa x, použitý fluorochrom APC750). Ve scattergramu je převaha buněk exprimující na svém povrchu znak CD19 (86 %). Referenční meze pro znak CD19+ na B-lymfocytech jsou 7–23 % (Reichert et al. 1991). Při zjištění patologie je analýza doplněna o další znaky typické pro B-lymfocyty (buňky CD19+).



Obrázek 21: Strategie určení základního imunofenotypu lymfocytů – protokol CLL1

Na obrázku v části A je gatovací strategie shodná s gatovací strategií panelu TBNK (Obrázek 20, část A). Dále si v části B pomocí gate s názvem B-lympho vyznačíme populaci B-lymfocytů (buňky CD19+), použitým fluorochromem pro detekci exprese znaku na povrchu analyzovaných buněk ve vzorku periferní krve pacienta (75 % B-lymfocytů). Gate s označením B-lympho je zdrojovým pro další ohraničení populací buněk v částech C – G. Procentuální zastoupení buněk s konkrétním CD znakem je tedy procento buněk z B-lymfocytů exprimující daný znak lymfocytů (zdrojový gate s názvem B-lympho je taktéž uvedený v hranatých závorkách nad osami). V části C jsou na ose y vyobrazeny buňky exprimující na svém povrchu znak CD5, použitým fluorochromem je PB. Na ose x jsou vyobrazeny buňky exprimující na svém povrchu znak CD19. V části D jsou na ose y vyobrazeny buňky, které

na svém povrchu exprimují znak CD23, použitý fluorochrom je APC. Na ose x jsou vyobrazeny buňky exprimující na svém povrchu znak CD19. V části E jsou na ose y vyobrazeny buňky, které na svém povrchu exprimují znak CD20, použitý fluorochrom je APC750. Na ose x jsou vyobrazeny buňky exprimující na svém povrchu znak CD19. Část F je vyhrazena pro zjištění exprese povrchových lehkých řetězců kappa/lambda na B-lymfocytech. Na ose y jsou vyobrazeny buňky exprimující na svém povrchu lehký řetězec lambda, použitým fluorochromem je PE. Na ose x jsou vyobrazeny buňky, které na svém povrchu exprimují lehký řetězec kappa, použitý fluorochrom je FITC. Je patrná restrikce povrchového řetězce lambda. Poměr povrchových lehkých řetězců kappa/lambda je patologický (poměr $\kappa/\lambda = 130$). Dle hodnoty poměru kappa/lambda se hodnotí klonalita lymfocytů. Normální poměr povrchových lehkých řetězců kappa/lambda je 0,3–3 (Špička et al. 2005). Ve scattergramy s označením G je na ose y znak CD10, použitým fluorochromem je PC5.5. Na ose x jsou vyobrazeny buňky exprimující na svém povrchu znak CD19.



Obrázek 22: Strategie určení základního imunofenotypu lymfocytů – protokol CLL2

Na obrázku v části A je gatovací strategie shodná s gatovací strategií panelu TBNK (Obrázek 20, část A). Dále si v části B pomocí gate s názvem B-lympho vyznačíme populaci B-lymfocytů (buňky CD19+). Zde jsou buňky rozděleny úměrně hustotě vnitřní struktury buněk a na základě exprese znaku CD19 na povrchu analyzovaných buněk ve vzorku periferní krve pacienta (75 % B-lymfocytů). V částech obrázku C, D, E, F je vyobrazena exprese znaků na B-lymfocytech (zdrojový gate s názvem B-lympho je taktéž uvedený v hranatých závorkách nad osami). V části C je vidět snížená exprese znaku FMC7 (osa y, použitým fluorochromem je FITC) na B-lymfocytech (osa x), v části D snížená exprese znaku 79b (osa y, použitým fluorochromem je PE) na B-lymfocytech (osa x) a v části E je vyobrazena exprese znaku CD200 (osa y, použitým fluorochromem je APC750) na B-lymfocytech (osa x). Je patrná exprese znaku CD200 na buňkách CLL. Část F znázorňuje expresi povrchových těžkých řetězců imunoglobulinů IgM (osa y, použitým fluorochromem je PB), méně IgD (osa x, použitým fluorochromem je APC).

8.2 Molekulární diagnostika pomocí PCR

8.2.1 Detekce SNP rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985

Vyšetření genetických jednonukleotidových polymorfizmů (Tabulka 4) bylo provedeno pomocí metody real-time PCR s použitím fluorochromem značených hybridizačních sond (LightSNip, TIB Molbiol).

Tabulka 4: Charakteristika analyzovaných SNP (Sillé et al. 2015)

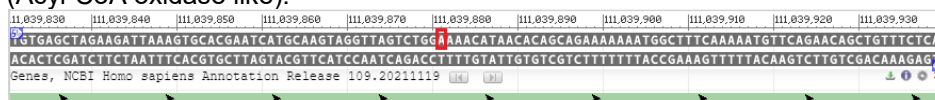
SNP	Lokus	Nejbližší gen	Substituce	Riziková alela	Umístění
rs17483466	2q13	ACOXL, BCL2L11	A>G	G	Intron 10 genu ACOXL
rs735665	11q24.1	GRAMD1B	G>A	A	~50 kb centromeric
rs7176508	15q23	-	A>G	A	chromozom 15
rs872071	6p25.3	IRF4	A>G	G	3'UTR
rs13397985	2q37.1	SP140	T>G	G	Intron 1

Pozn.: A (Adenine, adenin), G (Guanine, guanin), T (Thymine, thymin).

8.2.2 Hybridizační sondy

Pro analýzu SNP pomocí metody real-time PCR byly použity hybridizační sondy. Každá z použitých sond je komplementární ke konkrétnímu úseku lidské DNA a na základě vyhodnocení analýzy můžeme v testovaném genu, konkrétním úseku DNA identifikovat/neidentifikovat změnu v uspořádání nukleotidů v řetězci DNA. Níže uvádím jednotlivé sondy pro detekci záměny bazí v sekvenci nukleotidů DNA (Obrázek 23, Obrázek 24, Obrázek 25, Obrázek 26, Obrázek 27):

- rs17483466 – je označení pro sondu detekující změnu v sekvenci nukleotidů v genu ACOXL (Acyl-CoA oxidase like).



Obrázek 23: Pozice změny v genu ACOXL (NCBI – rs17483466 2021)

Označení pozice změny v genomové sekvenci DNA: GRCh38.p13 chr 2, NC_000002.12:g.111039881A>G. (NCBI – rs17483466 2021)

- rs735665 – je označení pro sondu detekující změnu v sekvenci nukleotidů v genu GRAMD1B (GRAM domain containing 1B).



Obrázek 24: Pozice změny v genu GRAMD1B (NCBI – rs735665 2021)

Označení pozice změny v genomové sekvenci DNA: GRCh38.p13 chr11, NC_000011.10:g.123490689G>A. (NCBI – rs735665 2021)

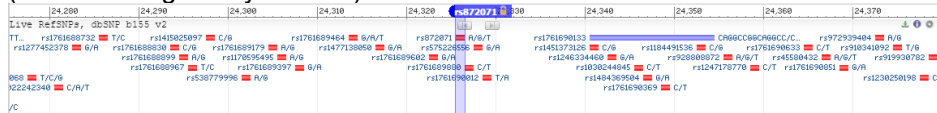
- rs7176508 – je označení pro sondu detekující změnu v sekvenci nukleotidů na chromosomu 15.



Obrázek 25: Pozice změny na chromosomu 15 (NCBI – rs7176508 2021)

Označení pozice změny v genomové sekvenci DNA: GRCh39.p13 chr 15, NC_000015.10:g.69726651A>G. (NCBI – rs7176508 2021)

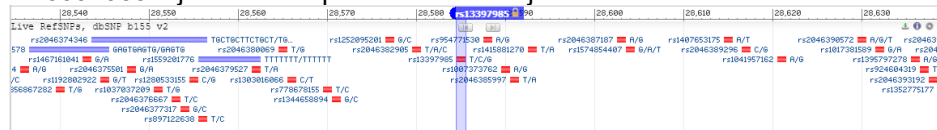
- rs872071 – je označení pro sondu detekující změnu v sekvenci nukleotidů v genu IRF4 (Interferon regulatory factor 4).



Obrázek 26: Pozice změny v genu IRF4 (NCBI – rs872071 2021)

Označení pozice změny v genomové sekvenci DNA: IRF4 RefSeqGene, NG_027728.1:g.24326A>G. (NCBI – rs872071 2021)

- rs13397985 – je označení pro sondu detekující změnu v sekvenci nukleotidů v genu SP140.



Obrázek 27: Pozice změny v genu SP140 (NCBI – rs13397985 2021)

Označení pozice změny v genomové sekvenci DNA: SP140 RefSeqGene, NG_051286.1:g.28585T>G. (NCBI – rs13397985 2021)

8.2.3 Izolace DNA

Izolace DNA z plné krve nebo séra (400 µl) pacienta byla provedena v automatickém izolátoru Magna Pure Compact. Jedná se o izolaci za použití magnetických částic. Vzorky jsou vystaveny působení proteinázy K v lyzačním pufru obsahujícím chaotropní soli. Poté jsou ke vzorku přidány magnetické částice. DNA ze vzorku se váže na tyto magnetické částice. Následuje odmytí nenavázaných molekul ze vzorku a v posledním kroku je DNA ze vzorku uvolněna pomocí elučního pufru do eluční zkumavky (eluát o objemu 100 µl) (Roche – MagNA Pure 2021).

Izolovaná DNA je do doby analýzy uložena při -80 °C.

8.2.4 Příprava analýzy

Oligonukleotidové sondy jsou dodávány v lyofilizované podobě a před použitím je nutné je rozpustit tzv. PCR vodou (PCR grade, speciálně upravená voda zbavená deoxyribonukleáz, ribonukleáz). Rozpuštěné lyofilizované oligonukleotidové sondy LightSNiP jsou stabilní do data expirace uvedené výrobcem, pokud se skladují za doporučených podmínek (po rozpuštění v mrazicím boxu při -20 °C).

Vzorky, hybridizační sondy a zkumavky z kitu LightCycler FastStart DNA MasterPLUS HybProbe se třepou a centrifugují. Před analýzou je nutné si připravit FS Mix (10 µl obsahu zkumavky 1a přidat do zkumavky 1b). Pro každou sondu se připraví vlastní Master Mix a smíchá se s jednotlivými sondami. Testovaná DNA a všechny chemikálie se pipetují do mikrotitrační destičky, která je po překrytí adhezni folií a krátké centrifugaci vložena do podavače LightCycleru k provedení vlastní real-time PCR. Před spuštěním analýzy DNA metodou real-time PCR na analyzátoru LightCycler je nutné jej naprogramovat (Tabulka 5). Pro použité oligonukleotidové sondy byla zvolena detekce signálu při 465–510 nm.

Pipetovací protokol pro jednu reakci:

5,5 µl PCR H₂O + 2 µl master mix + 0,5 µl sondy + 2 µl DNA
real-time PCR

Tabulka 5: Teplotní profil real-time PCR

Program	Denaturace	Amplifikace			Tání			Chlazení
Parametr								
Mód analýzy	-	kvantifikace			křivky tání			-
Počet cyklů	1	45			1			1
Teplota (°C)	95	95	60	72	95	40	75	40
Čas	10 min	10 s	10 s	15 s	30 s	2 min	0 s	30 s
Ramp rate (°C/s)	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	1,5	-	1,5
Sběr dat	-	-	single	-	-	-	contin. (3 za °C)	-

V tabulce jsou přehledně popsány jednotlivé módy analýzy, příslušné teploty průběhu PCR i počet cyklů amplifikace.

8.2.5 Instrumentace

Metodu real-time PCR umožňuje provádět přístroj LightCycler 480 od firmy Roche, který je rutinně na Oddělení laboratorní medicíny využíván pro genotypizaci genu TPMT, DPYD a v současné situaci také pro detekci nukleové kyseliny viru SARS-CoV-2.

Veškerá data experimentu jsou shromážděna, uložena v reálném čase a pro následnou úpravu dat je využíván LightCycler Software.

LightCycler je tvořený optickým systémem vybaveným xenonovou lampou, která vyzařuje světlo o určité vlnové délce. Lze dosáhnout specifické excitace a emise fluorescenčních barviv. K provedení analýzy je nutné volit vhodnou kombinaci vestavěných filtrů. Přístroj umožňuje výběr fluorescenčního kanálu, který má být analyzován a dále barevnou kompenzací, která je vždy aplikována ke konkrétní kombinaci filtru. K detekci signálu slouží monochromatická CCD kamera. Analýza probíhá v cyklech pro 96 nebo 384 vzorků v závislosti na použitém termobloku.

Přístroj je řízený softwarem a na základě informací definovaných v protokolu analýzy (např. teplota, počet cyklů pro ohřev a ochlazení) je provedena analýza (Roche – LightCycler 2016).

8.2.6 Interpretace analýzy genové exprese

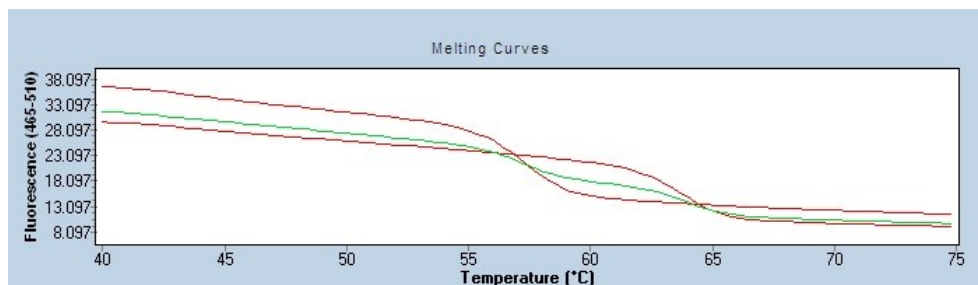
Pro vyhodnocení genové exprese jsem v mojí práci využila analytickou techniku relativní kvantifikace. Hodnotí se změny genové exprese v analyzovaném vzorku (DNA analyzovaného vzorku pacienta) porovnáním s pozitivní kontrolou a tzv. wild-type sekvencí (Biaassoni and Raso 2014). Stanovení genotypu je provedeno na základě analýzy křivek teploty tání (T_m – Melting Temperature)

hybridizačních sond LightSNiP (TibMolBiol). Hodnocení výsledků analýzy se provádí pomocí softwaru LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0.

Po proběhnutí reakce se provede analýza křivek tání (Melting Curve Analysis, Obrázek 28). Výsledkem vyšetření je genotyp příslušného genu vyjádřený jako:

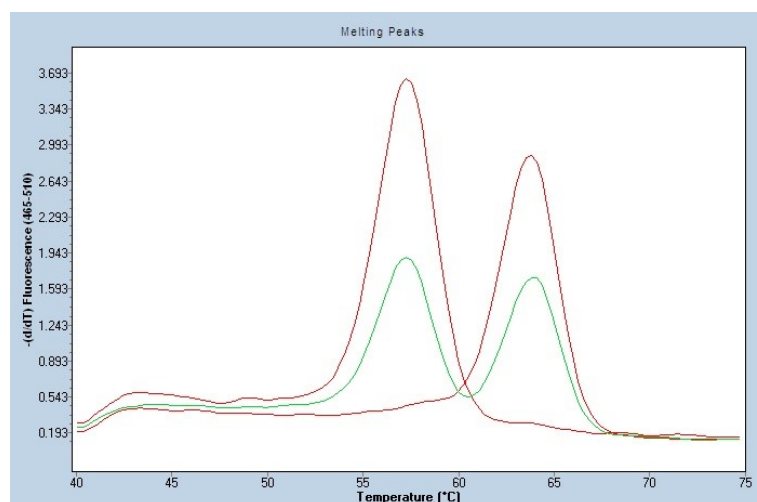
- wild-type v případě, že nebyla detekována žádná ze studovaných mutací,
- mutovaný (s uvedením detekované mutace/polymorfizmu).

Kromě zobrazení křivek tání je možné i převedení na tzv. Melting Peaks (Obrázek 29). V grafu jsou pak přehledně vyobrazeny píky pro wild-type sekvenci, homozygotní mutanty a heterozygotní formy. Jednotlivé varianty od sebe lze odlišit počtem a polohou píků.



Obrázek 28: Analýza křivek tání

Graf ukazuje vztah mezi fluorescencí a teplotou pro použitou sondu s ohledem na sekvenci DNA. V softwaru si pracovník nastaví teplotu (uvedeno v příbalovém letáku pro každou sondu), při které je dosaženo maximální intenzity fluorescence, následně dochází k odtávání sondy. Tato teplota je charakteristická pro výskyt konkrétní dusíkaté báze v sekvenci DNA. Z křivek tání je tak možné určit, zda je v příslušné sekvenci DNA detekován SNP, tedy záměna nukleotidu (např. A>G). Zelená křivka tání znázorňuje heterozygotní zastoupení alel (2 různé alely). Červená křivka s teplotním maximem 57 °C je v tomto případě (sonda rs17483466) charakteristická pro výskyt dusíkaté báze A v sekvenci DNA, druhá červená křivka s teplotním maximem 64 °C pro výskyt dusíkaté báze G v sekvenci DNA. Na grafu je tedy zobrazena heterozygotní forma (jedna alela se sekvencí DNA, kde je v daném místě dusíkatá báze A druhá alela mutovaná, tj. v sekvenci DNA se v daném místě nachází dusíkatá báze G), wild-type sekvence genu (dusíkatá báze A v sekvenci DNA) a mutovaná sekvence (dusíkatá báze G v sekvenci DNA).



Obrázek 29: Melting Peaks

Pík s T_m 57,16 °C (gen ACOXL, sonda rs17483466) zobrazuje v tomto konkrétním případě dusíkatou bázi A v sekvenci DNA, píky s T_m 63,54 °C dusíkatou bázi G v sekvenci DNA. Zeleně zbarvené píky odpovídají heterozygotní formě.

9 Výsledky

U všech jedinců testovaného souboru byl stanovený krevní obraz, imunofenotyp lymfocytů a provedena genotypizace vybraných polymorfizmů. Pro imunofenotypizaci lymfocytů a analýzu SNP byli náhodně vybráni jednotlivci z České republiky, kteří byli na základě imunofenotypizace lymfocytů zařazeni do skupiny kontrolní (Tabulka 6) a skupiny pacientů s diagnostikovanou CLL, v některých případech MBL. Kontrolní skupina zahrnovala vzorky periferní krve 100 osob, které byly na základě stanovení krevního obrazu, imunofenotypu lymfocytů vyhodnoceny jako normální. Polovina vzorků kontrolní skupiny byla od osob účastnících se preventivního onkologického programu v MOÚ v Brně (období 1.–30. 3. 2021), tedy považovaných za zdravé kontroly. Druhá polovina vzorků kontrolní skupiny byla od osob, u nichž byla současně diagnostikována solidní malignita, avšak nebyli doposud léčeni (1. návštěva v MOÚ, vzorky pacientů získány v období 1.6.–22. 10. 2018). Pohlaví v kontrolní skupině bylo zastoupeno rovnoměrně (50 % ženy, 50 % muži), Medián věku skupiny jedinců z prevence byl 59 (IQR 56, 66; IQR – Interquartile range, mezikvartilové rozpětí), skupiny jedinců se solidním tumorem 61 (IQR 52, 74). Druhou analyzovanou skupinou vzorků byla skupina 50 pacientů (vzorky archivovány v letech 2005–2019), u kterých byla naplněna diagnostická kritéria pro diagnózu CLL nebo MBL na základě zjištěné hodnoty lymfocytů při stanovení krevního obrazu a imunofenotypu lymfocytů, tzv. CLL/MBL skupina (Tabulka 7). Počet jedinců se solidním tumorem a CLL nebo MBL byl 39. 11 jedinců ze skupiny CLL/MBL nemělo diagnostikovanou solidní malignitu (například pacienti s hypertenzí, benigní hyperplazie prostaty). Ve skupině CLL/MBL bylo vyšší zastoupení mužů (62 %). Medián věku této skupiny byl 71 (IQR 64, 77). Většina jedinců v této skupině (39 z 50) měla kromě nálezů abnormálního imunofenotypu lymfocytů diagnostikovaný také solidní tumor. V případech solidních tumorů se jednalo nejčastěji o karcinom prsu (44 %), kolorektální karcinom (31 %), zhoubné novotvary močového traktu (15 %), či maligní melanom (10 %).

Tabulka 6: Profil kontrolní skupiny

		Prevence	Solidní tumor	Celkový počet osob
Kontrolní skupina (počet osob)		50	50	100
Pohlaví (počet, %)	ženy	20 (40 %)	30 (60 %)	50 (50 %)
	muži	30 (60 %)	20 (40 %)	50 (50 %)
Věk (medián, rozsah)	všichni	59 (51, 75)	61 (19, 90)	
	ženy	59 (52, 75)	53 (32, 90)	
	muži	59 (51, 71)	64 (19, 87)	

Tabulka 7: Profil skupiny CLL/MBL

		CLL + solidní tumor	MBL + solidní tumor	CLL, MBL bez solidního tumoru	Celkový počet osob
CLL/MBL skupina (počet osob)		27	12	11	50
Pohlaví	ženy	12 (44 %)	4 (33 %)	2 (18 %)	18 (36 %)
	muži	15 (56 %)	8 (67 %)	9 (82 %)	32 (64 %)
Věk (medián, rozsah)	všichni		71 (37, 85)		
	ženy		75 (37, 85)		
	muži		70 (42, 84)		

9.1 Statistická analýza

Pro popis dat byly použity základní nástroje popisné statistiky, tj. medián, mezikvartilové rozpětí pro spojité charakteristiky a počty a procenta pro kategoriální charakteristiky. Rovnovážné rozložení alel ve studovaných skupinách, tedy Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE), bylo testováno pomocí Fisherova přesného testu. Rozdíl zastoupení genotypů mezi kontrolní a CLL/MBL skupinou byl testován pomocí Fisherova přesného testu. Vliv polymorfizmů na riziko vzniku onemocnění MBL nebo CLL byl analyzován pomocí logistické regrese. Byly vypočítány poměry šancí (OR – Odds ratio) adjustované na věk včetně jejich 95% intervalů spolehlivosti (CI – Confidence interval). Pro vyjádření pravděpodobnosti, že se do určitého věku nevyskytne onemocnění CLL nebo MBL, byly použity metody analýzy přežití, konkrétně Kaplanův-Meierův odhad funkce přežití a log-rank test. Všechny testy byly provedeny na hladině významnosti 5 %. Ke statistickému hodnocení byl použit software R, verze 4.1.3.

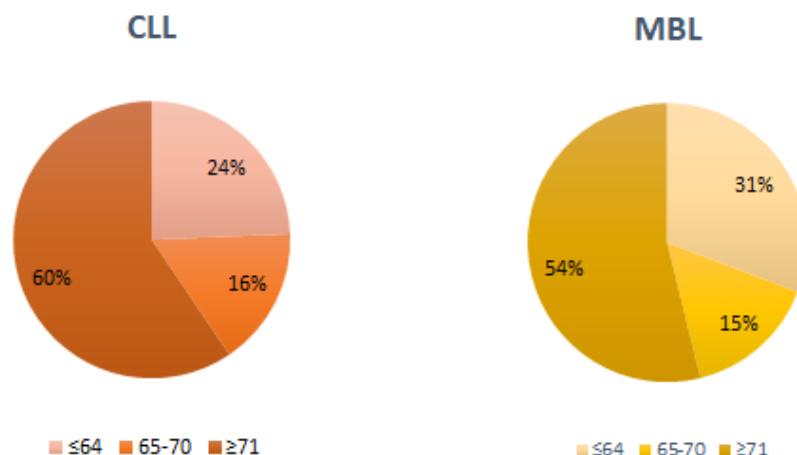
9.2 Imunofenotypizace lymfocytů

Imunofenotypizace lymfocytů byla provedena u kontrolní skupiny (100 osob), CLL/MBL skupiny (50 osob). Ve skupině CLL/MBL byla u 37 osob stanovena diagnóza CLL, u 13 osob MBL. U všech případů CLL nebo MBL byl stanovený imunofenotyp typický pro buňky CLL. V případě MBL se jedná o typ MBL označovaný jako CLL-like (Strati et al. 2015).

Stavy monoklonální B-lymfocytózy se podle počtu klonálních B-lymfocytů kategorizují na skupinu s nízkým počtem klonálních B-lymfocytů v periferní krvi ($< 0,5 \times 10^9/l$) a s vysokým počtem klonálních B-lymfocytů v periferní krvi ($> 0,5 \times 10^9/l$) (Strati et al. 2015). Všech 13 jedinců ve skupině CLL/MBL s onemocněním MBL bylo zařazeno do skupiny s vysokým počtem B-lymfocytů.

Byl zhodnocený výskyt CLL nebo MBL v závislosti na věku (Obrázek 30) a pohlaví jedince. Medián věku osob kontrolní skupiny z preventivního programu MOÚ je 59 let, s nově diagnostikovaným solidním tumorem 61 let. Medián věku jedinců s onemocněním CLL v době stanovení diagnózy byl 71 let, u MBL 72 let.

V celé kontrolní skupině bylo 50 % žen a 50 % mužů. Ve skupině CLL/MBL převažuje mužské pohlaví, procentuální zastoupení mužů ve skupině CLL/MBL je 62 %. Více jak polovina pacientů s diagnózou CLL i MBL byli muži.



Obrázek 30: Zastoupení věkové kategorie v době diagnózy CLL a MBL

Výskyt onemocnění CLL roste úměrně věku pacientů a přibližně koreluje také se záchytem MBL, kde je však patrný posun do mladších věkových skupin. Incidence CLL ve věku ≤ 64 je 24 %, o něco méně je to ve věku 65–70 let, a to 16 %. Výrazný nárůst je registrován ve věkové skupině nad 71 let, a to 60 %. U pacientů s MBL je také nejvyšší zastoupení registrováno u pacientů ve věku vyšším než 71 let.

9.3 Záchyt onemocnění CLL nebo MBL u pacientů se solidním tumorem

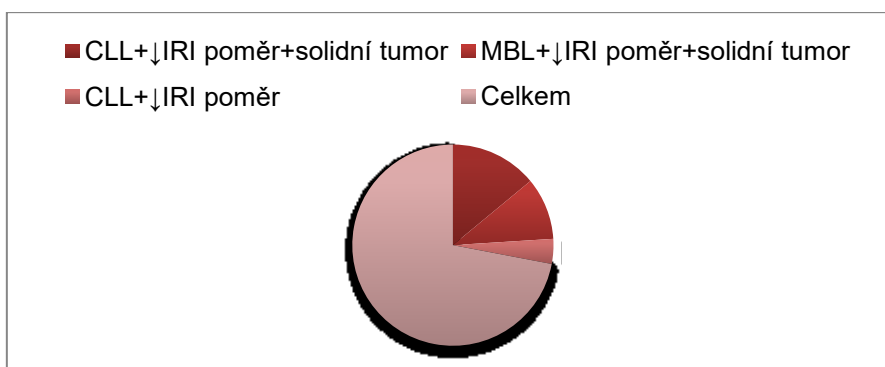
Vzorek pacienta na OLM MOÚ s hodnotami lymfocytů $\geq 4,5 \times 10^9/l$ v krevním obraze, výskytem hlášení hematologického analyzátoru Abn Lympho? či morfologicky suspektních lymfocytů v nátěru periferní krve je dále došetřován. Je určen imunofenotyp buněk pomocí průtokového cytometru. Tak je docíleno i záchytu MBL, tedy stavu, kdy nejsou naplněna početní ani klinická kritéria pro stanovení diagnózy CLL/SLL.

Ve skupině pacientů CLL/MBL bylo 50 osob, které byly do této skupiny zařazeny na základě počtu a imunofenotypu lymfocytů, který odpovídal diagnóze CLL/MBL. Ve skupině CLL/MBL byla u 37 jedinců diagnostikována CLL, u 13 jedinců byla stanovena diagnóza MBL. Pouze ve 3 případech (6 %) bylo primárně diagnostikované onemocnění CLL, následně také solidní tumor (v rozmezí 2 měsíců až 20 let). V 11 případech (22 %) evidujeme pouze diagnózu CLL nebo MBL bez další malignity (údaj k 03/2022). Ve 36 případech byl diagnostikován solidní tumor a v následujících letech došlo k laboratornímu záchytu další malignity, tj. CLL nebo asymptomatickému stavu označovanému jako MBL. Vzhledem k tomu, že diagnóza CLL i MBL je často zachycena náhodně a u pacientů byl vyšetřený imunofenotyp B-lymfocytů až na podkladě lymfocytózy, či suspektního hlášení Abn Lympho? Při stanovení krevního obrazu nelze s jistotou říct, že u pacienta došlo primárně k rozvoji solidního tumoru. U pacientů se solidním tumorem je obecně popisováno vyšší riziko onemocnění CLL nebo MBL oproti pacientům bez solidního tumoru, nicméně takovou souvislost nelze v rámci této práce analyzovat, a to zejména vzhledem k výběru hodnocené skupiny a tomu, že spektrum pacientů Masarykova onkologického ústavu tvoří převážně onkologičtí pacienti.

Při rozlišení diagnózy CLL a MBL byla z 50 jedinců ve skupině CLL/MBL u 27 osob diagnostikována solidní malignita, v pozdější době také CLL. S výjimkou jednoho pacienta (informace o diagnóze solidního tumoru není k dispozici) byl solidní tumor diagnostikován u všech pacientů

s onemocněním MBL. Průměrný počet let od doby stanovení diagnózy solidní malignity do doby laboratorního záchytu CLL je v naší CLL/MBL skupině 5 let.

Pro základní zhodnocení imunitního stavu jedinců s CLL/MBL jsem se podívala na hodnoty poměru CD4+/CD8+ T-lymfocytů, tzv. imunoregulační index (IRI poměr). Pouze u menšiny osob (28 % jedinců) byl v době laboratorního záchytu CLL/MBL zjištěný patologický poměr (hodnoty se pohybovaly 0,46–1,0) T-lymfocytů CD4+/CD8+ (Obrázek 31) (norma CD4:CD8 je přibližně 2:1, tj. poměr $\geq 1,2$). (Lu et al. 2015) U žádného pacienta s diagnózou CLL nebo MBL nicméně není ve zdravotnické dokumentaci záznam o primární imunodeficienci, jež by mohla být také předpokladem k rozvoji lymfoproliferativního onemocnění.



Obrázek 31: IRI poměr u pacientů s CLL nebo MBL

Převážná většina osob s diagnózou CLL nebo MBL (72 %) měla normální poměrné zastoupení lymfocytů CD4+/CD8+.

9.4 Genotypizace: Zastoupení alel a genotypů v celém souboru jedinců

Analýzu vybraných jednonukleotidových polymorfizmů se úspěšně podařilo provést u všech osob. V níže uvedených obrázcích (Obrázek 32, Obrázek 33, Obrázek 34, Obrázek 35, Obrázek 36) je zobrazeno grafické znázornění procentuálního zastoupení jednotlivých alel a výsledných genotypů obou skupin, tj. kontrolní skupiny a skupiny CLL/MBL. V tabulce (Tabulka 6) je uvedené zastoupení jednotlivých alel a výsledných genotypů ve vyšetřovaných polymorfizmech (rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985). Tabulka uvádí procentuální zastoupení genotypů samostatně v kontrolní a CLL/MBL skupině.



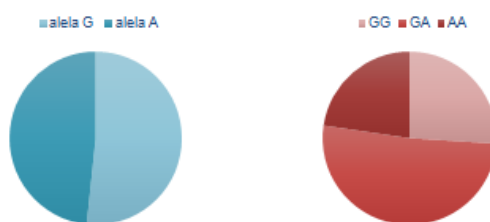
Obrázek 32: Zastoupení jednotlivých alel a výsledných genotypů, rs17483466

V levé části obrázku (modře zbarvený výšečový graf) je znázorněné zastoupení alely A a alely G (riziková alela). V celém souboru jedinců je ve vyšetřovaném polymorfizmu v 79,7 % zastoupená alela A, v 20,3 % alela G. V pravé části obrázku (červeně zbarvený výšečový graf) je znázorněné zastoupení výsledných genotypů testovaného souboru jedinců, tj. genotypu AA (64,7 %), AG (30 %), GG (5,3 %).



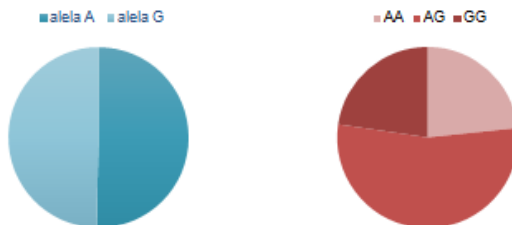
Obrázek 33: Zastoupení jednotlivých alel a výsledných genotypů, rs735665

V levé části obrázku (modře zbarvený výsečový graf) je znázorněné zastoupení alely G a alely A (riziková alela). V celém souboru jedinců je ve vyšetřovaném polymorfizmu v 73 % zastoupená alela G, v 27 % alela A. V pravé části obrázku (červeně zbarvený výsečový graf) je znázorněné zastoupení výsledných genotypů testovaného souboru jedinců, tj. genotypu GG (52,7 %), GA (40,7 %), AA (6,7 %).



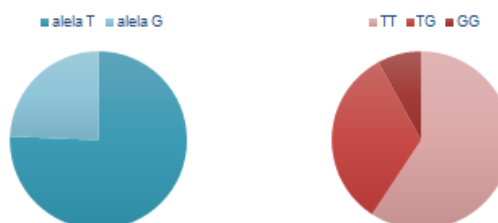
Obrázek 34: Zastoupení jednotlivých alel a výsledných genotypů, rs7176508

V levé části obrázku (modře zbarvený výsečový graf) je znázorněné zastoupení alely G a alely A (riziková alela). V celém souboru jedinců je ve vyšetřovaném polymorfizmu v 48,3 % zastoupená alela A, v 51,7 % alela G. V pravé části obrázku (červeně zbarvený výsečový graf) je znázorněné zastoupení výsledných genotypů testovaného souboru jedinců, tj. genotypu GG (26 %), GA (51,3 %), AA (22,7 %).



Obrázek 35: Zastoupení jednotlivých alel a výsledných genotypů, rs872071

V levé části obrázku (modře zbarvený výsečový graf) je znázorněné zastoupení alely A a alely G (riziková alela). V celém souboru jedinců je ve vyšetřovaném polymorfizmu v 50,3 % zastoupená alela A, v 49,7 % alela G. V pravé části obrázku (červeně zbarvený výsečový graf) je znázorněné zastoupení výsledných genotypů testovaného souboru jedinců, tj. genotypu AA (23,3 %), AG (54 %), GG (22,7 %).



Obrázek 36: Zastoupení jednotlivých alel a výsledných genotypů, rs13397985

V levé části obrázku (modře zbarvený výsečový graf) je znázorněné zastoupení alely T a alely G (riziková alela). V celém souboru jedinců je ve vyšetřovaném polymorfizmu v 75,7 % zastoupená alela T, v 24,3 % alela G. V pravé části obrázku (červeně zbarvený výsečový graf) je znázorněné zastoupení výsledných genotypů testovaného souboru jedinců, tj. genotypu TT (59,3 %), TG (32,7 %), GG (8 %).

9.5 Zastoupení polymorfizmů u pacientů s CLL/MBL a kontrolní skupiny

Zastoupení alel vyšetřovaných polymorfizmů (rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985) kontrolní skupiny, CLL/MBL skupiny a výsledky testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy společně s p-hodnotou pro ověření HWE uvádí

Tabulka 8. HWE je splněna v obou testovaných souborech. Výsledné p-hodnoty jsou pod hladinou statistické významnosti.

Tabulka 8: Zastoupení alel u vyšetřovaných polymorfizmů v kontrolní a CLL/MBL skupině a výsledky testování HWE

SNP	Alela		Soubor	p-hodnota
rs17483466 A>G	A	G	Kontrolní skupina	0,131
	79 %	21 %		
	A	G	CLL/MBL skupina	0,668
	81 %	19 %		
rs735665 G>A	G	A	Kontrolní skupina	0,776
	78 %	22 %		
	G	A	CLL/MBL skupina	0,765
	63 %	37 %		
rs872071 A>G	A	G	Kontrolní skupina	0,229
	49 %	51 %		
	A	G	CLL/MBL skupina	0,782
	47 %	53 %		
rs7176508 A>G	A	G	Kontrolní skupina	>0,999
	51,5 %	48,5 %		
	A	G	CLL/MBL skupina	0,776
	48 %	52 %		
rs13397985 T>G	T	G	Kontrolní skupina	0,591
	76 %	24 %		
	T	G	CLL/MBL skupina	0,118
	76 %	24 %		

V levém sloupci tabulky je uvedený polymorfizmus včetně informace, o jakou záměnu nukleotidu se ve vyšetřovaném úseku DNA jedná, např. rs735665 G>A je označení pro záměnu nukleotidu G za A v genu GRAMD1B. V pravé části jsou uvedeny p-hodnoty vždy pro zastoupení alel u jednotlivých polymorfizmů pro každou skupinu samostatně, jež prokazují splnění podmínek výběru populace pro asociační studii (není statisticky významný rozdíl v zastoupení alel u kontrolní skupiny a skupiny CLL/MBL, tj. p-hodnota > 0,05). Platnost HWE je důležitá zejména ve skupině kontrol. Je tak možné předejít zkreslení asociační studie v důsledku nesplnění HWE (Ziegler et al. 2011).

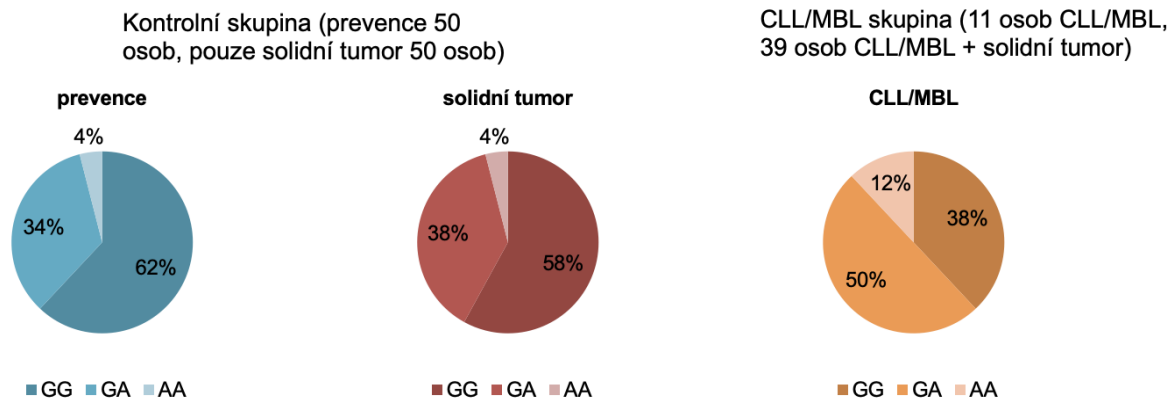
9.6 Asociace genotypů s onemocněním CLL/MBL

Porovnáním jednotlivých vyšetřených polymorfizmů a výsledných genotypů (Tabulka 9) byla zhodnocena míra asociace konkrétního polymorfizmu a onemocnění CLL nebo MBL. Porovnáním polymorfizmů rs17483466, rs872071, rs7176508, rs13397985 u kontrolní a CLL/MBL skupiny nebyla

prokázána asociace jednotlivých genotypů s vývojem onemocnění CLL/MBL. Při rozlišení diagnózy CLL a MBL výsledné p-hodnoty kopírují p-hodnoty získané při analýze CLL/MBL skupiny jako celku.

U polymorfismu rs735665 je pozorováno rozdílné zastoupení genotypů mezi kontrolní skupinou a skupinou CLL/MBL. U polymorfismu rs735665 byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl zastoupení rizikové alely A mezi kontrolní skupinou a skupinou CLL/MBL.

Dále je pozorován statisticky významný rozdíl ($p = 0,036$) v zastoupení genotypů s rizikovou alelou mezi CLL/MBL skupinou a skupinou prevence i solidní tumor, které dohromady tvoří kontrolní skupinu. Detekovaný polymorfismus (rs735665) může být považován za kauzální ve vztahu k CLL nebo MBL.



Obrázek 37: Zastoupení genotypů: rs735665 nejbliže genu GRAMD1B

Procentuálně vyšší zastoupení genotypů s rizikovou alelou A je pozorováno u skupiny CLL/MBL (pacienti s diagnózou CLL/MBL, v 39 případech i se solidním tumorem). U skupiny CLL/MBL klesá procento genotypu bez rizikové alely (homozygotní stav GG) a naopak je pozorován trend vyššího zastoupení genotypu AA (homozygotního stavu s dvěma rizikovými alelami). Tento rozdíl je patrný mezi skupinou prevence a skupinou CLL/MBL, stejně tak mezi skupinou pacientů pouze se solidním tumorem a skupinou CLL/MBL.

Tabulka 9: Zastoupení genotypů v kontrolní a CLL/MBL skupině

SNP	Genotyp (počet/procento jedinců s daným genotypem)			Soubor	p-hodnota
rs17483466 A>G	AA	AG	GG	Kontrolní skupina	0,904
	65 (65 %)	28 (28 %)	7 (7 %)	CLL/MBL skupina	
	32 (64 %)	17 (34 %)	1 (2 %)		
	AA	AG+GG			
	65 (65 %)	35 (35 %)		Kontrolní skupina	
	32 (64 %)	18 (36 %)		CLL/MBL skupina	
rs735665 G>A	GG	GA	AA	Kontrolní skupina	0,011
	60 (60 %)	36 (36 %)	4 (4 %)	CLL/MBL skupina	
	19 (38 %)	25 (50 %)	6 (12 %)		
	GG	GA+AA			
	60 (60 %)	40 (40 %)		Kontrolní skupina	
	19 (38 %)	31 (62 %)		CLL/MBL skupina	
rs872071 A>G	AA	AG	GG	Kontrolní skupina	0,891
	26 (26 %)	57 (57 %)	20 (20 %)	CLL/MBL skupina	
	12 (24 %)	24 (48 %)	14 (28 %)		
	AA	AG+GG			
	23 (23 %)	77 (77 %)		Kontrolní skupina	
	12 (24 %)	38 (76 %)		CLL/MBL skupina	
rs7176508 A>G	GG	AG	AA	Kontrolní skupina	>0,999
	26 (26 %)	50 (50 %)	24 (24 %)	CLL/MBL skupina	
	13 (26 %)	24 (48 %)	10 (20 %)		
	GG	GA+AA			
	26 (26 %)	74 (74 %)		Kontrolní skupina	
	13 (26 %)	37 (74 %)		CLL/MBL skupina	
rs13397985 T>G	TT	TG	GG	Kontrolní skupina	0,638
	58 (58 %)	35 (35 %)	7 (7 %)	CLL/MBL skupina	
	31 (62 %)	14 (28 %)	5 (10 %)		
	TT	TG+GG			
	58 (58 %)	42 (42 %)		Kontrolní skupina	
	31 (62 %)	19 (38 %)		CLL/MBL skupina	

V levé části tabulky je uvedený polymorfismus včetně informace, o jakou záměnu nukleotidu se ve vyšetřovaném úseku DNA jedná, např. rs735665 G>A je označení pro záměnu nukleotidu G za A v genu GRAMD1B. Výsledné genotypy popisují zastoupení alel v daném místě a procentuální zastoupení výsledných genotypů u kontrolní skupiny (vzorky pacientů z preventivního programu a pacientů se solidním tumorem) a skupiny pacientů s CLL nebo MBL, tj. CLL/MBL skupiny. U každého polymorfismu je uvedeno zastoupení jednotlivých genotypů a dále genotypů s rizikovou alelou v porovnání zastoupení genotypů bez rizikové alely. Statisticky významný rozdíl mezi skupinami vyjádřený p-hodnotou je pozorován u SNP rs735665 (p = 0,011).

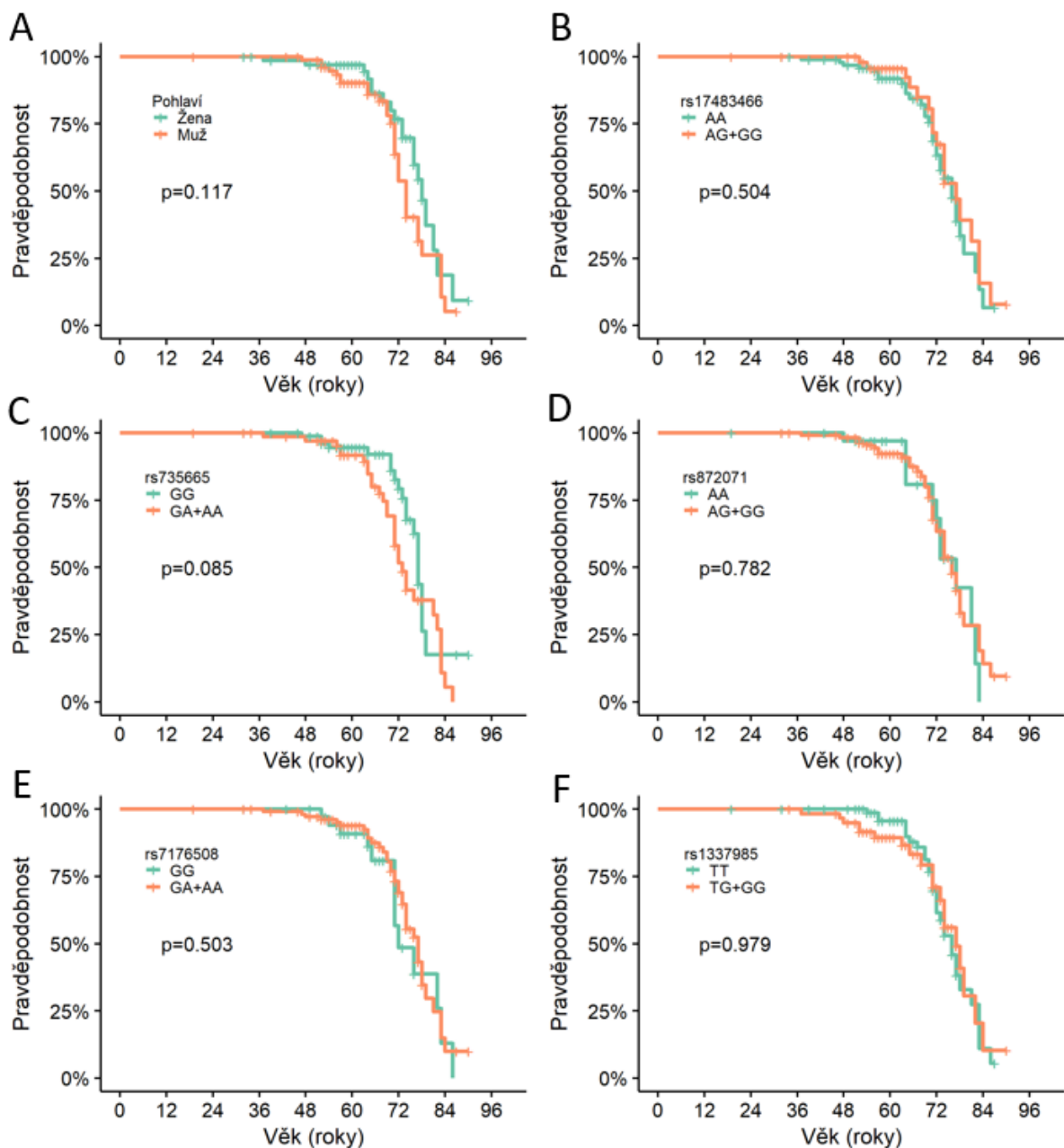
Porovnáním genotypů zastoupených u kontrolní skupiny a skupiny CLL/MBL adjustovaných také na věk jedince (vzhledem k různému věkovému rozložení v porovnávaných skupinách) byla prokázána asociace polymorfizmu rs735665 s onemocněním CLL nebo MBL. U některých polymorfizmů je v případě, kdy je riziková alela zastoupena 2× (homozygotní stav) pozorován trend k vyššímu riziku rozvoje CLL: rs17483466 genotyp GG; rs735665 genotyp AA, rs7176508 genotyp AA, rs13397985 genotyp GG. Výsledná p-hodnota u zmíněných genotypů má klesající charakter (Tabulka 10), tyto genotypy jsou však zastoupeny jen u nízkého počtu jedinců.

Tabulka 10: Asociace genotypů s onemocněním CLL, MBL

SNP	Genotyp	OR	95% CI	p-hodnota
rs17483466	AA	Referenční		
	AG	1,12	0,50–2,47	0,777
	GG	0,29	0,01–1,96	0,275
	AG+GG	0,96	0,44–2,06	0,926
rs735665	GG	Referenční		
	GA	2,39	1,09–5,32	0,030
	AA	9,02	1,92–50,6	0,007
	GA+AA	2,81	1,34–6,11	0,007
rs872071	AA	Referenční		
	AG	0,72	0,29–1,81	0,475
	GG	1,38	0,48–4,05	0,547
	AG+GG	0,88	0,37–2,13	0,770
rs7176508	GG	Referenční		
	GA	0,95	0,40–2,31	0,908
	AA	0,69	0,24–1,99	0,499
	GA+AA	0,86	0,38–2,02	0,729
rs13397985	TT	Referenční		
	TG	0,75	0,33–1,69	0,496
	GG	2,01	0,51–7,76	0,307
	TG+GG	0,92	0,43–1,94	0,825

Pozn.: *OR (Odds ratio, poměr šancí), **CI (Confidence interval, interval spolehlivosti)

Níže uvedená statistická analýza predikuje (Obrázek 37), v jakém věku a s jakou konkrétní změnou v pořadí nukleotidů DNA by mohlo dojít k rozvoji CLL nebo MBL. Dále byl analyzován vliv pohlaví jedince na vznik onemocnění CLL/MBL. Věk vzniku zmíněného onemocnění se mezi pohlavími statisticky významně neliší (p-hodnota = 0,117). Nicméně z grafického znázornění je vidět, že se onemocnění CLL nebo MBL vyskytlo u mužů v nižším věku.

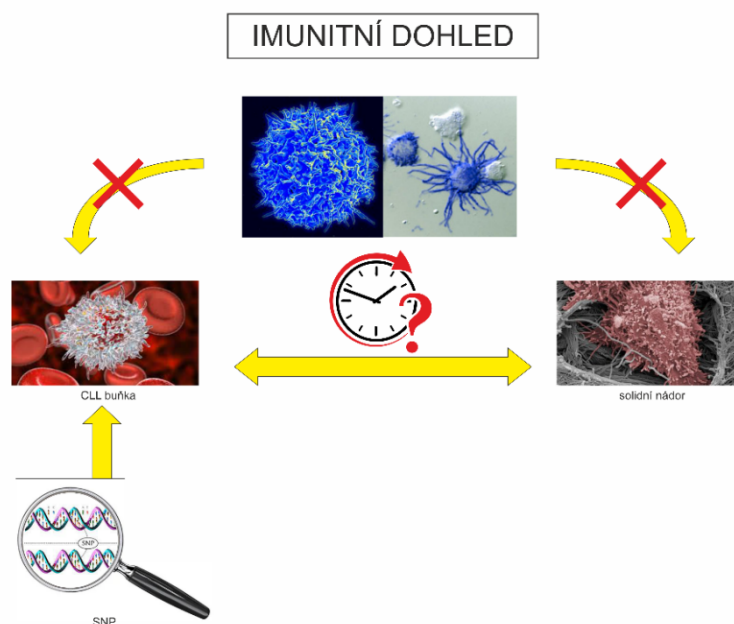


Obrázek 37: Asociace genotypů adjustovaných na věk jedince

Na obrázku je grafické znázornění pravděpodobnosti, že do daného věku nevznikne onemocnění CLL nebo MBL, v závislosti na pohlaví a analyzovaných SNP. Část A znázorňuje pravděpodobnost, že do daného věku nevznikne onemocnění CLL nebo MBL, vztaženou na pohlaví jedince. Zelená linie zobrazuje ženy, oranžová linie muže. Každému testovanému SNP odpovídá jeden graf (část B–F), který vyobrazuje pravděpodobnost, že do daného věku nevznikne onemocnění CLL nebo MBL, u pacientů s detekovaným/nedetekovaným konkrétním polymorfizmem. Osa y charakterizuje pravděpodobnost vzniku onemocnění CLL nebo MBL, osa x věk jedinců. Zelená linie zobrazuje jedince s genotypem bez záměny nukleotidů, oranžová linie se záměnou nukleotidů a rizikovou alelou.

10 Diskuze

Masarykův onkologický ústav v Brně je zaměřen primárně na léčbu solidních nádorů dospělých pacientů. Vyšetření hematologických malignit včetně lymfoproliferativních onemocnění je tedy na OLM MOÚ prováděno nejčastěji jako reflexní test v případě abnormalit v krevním obraze (lymfocytóza, hlášení analyzátoru upozorňující na suspektní abnormální lymfocyty Abn Lympho? apod.) a často se jedná o náhodný záchyt. U pacientů se solidními nádory je dle různých studií pozorován zvýšený výskyt hematologických malignit, a to z několika důvodů: často v důsledku cytotoxické protinádorové terapie, dále lze předpokládat vliv genetické predispozice či deregulace imunitního systému (Obrázek 38). Sládková (2019) studovala na OLM MOÚ frekvenci výskytu lymfoproliferací u pacientů se solidním nádorem v době jeho diagnózy (tedy u pacientů doposud neléčených protinádorovou terapií) a porovnávala ji se skupinou jedinců představujících kontrolní skupinu (osoby účastníci se preventivního onkologického programu na MOÚ, bez diagnostikovaného onkologického onemocnění). V této studii potvrdila zvýšenou prevalenci lymfoproliferací u pacientů se solidní malignitou (zejména CLL nebo MBL typu CLL), a to prokazatelně bez vlivu onkologické terapie. V této práci jsem se tedy v návaznosti na předešlou studii Sládkové (2019) zaměřila na studium asociace vybraných polymorfizmů (uváděných v dalších studiích – Slager et al. 2010, Crowther-Swanepoel et al. 2010, Di Bernardo et al. 2008) s CLL/MBL u skupiny pacientů, která zahrnuje převážně pacienty se současně diagnostikovaným solidním nádorem.



Obrázek 38: Schématické znázornění možných příčin asociace CLL a solidního tumoru

MBL i CLL lze do jisté míry označit za imunosupresivní stavy, které jsou spojeny se zvýšenou incidencí solidního tumoru. Je tedy otázkou, zda se CLL, MBL vyvíjí v důsledku deregulace imunitního systému u pacientů se solidním tumorem (bez poruchy imunitního systému v důsledku cytotoxicky působící protinádorové terapie) či naopak ke zvýšenému riziku rozvoje solidního tumoru dochází v důsledku porušení imunitního systému chronickým onemocněním, tj. lymfoproliferací. Otázkou také zůstává, do jaké míry hrají roli u pacientů se solidními nádory SNP či jiné genetické predispozice, které mohou mít vliv na zvýšené riziko rozvoje MBL, CLL.

10.1 Algoritmus laboratorní detekce MBL

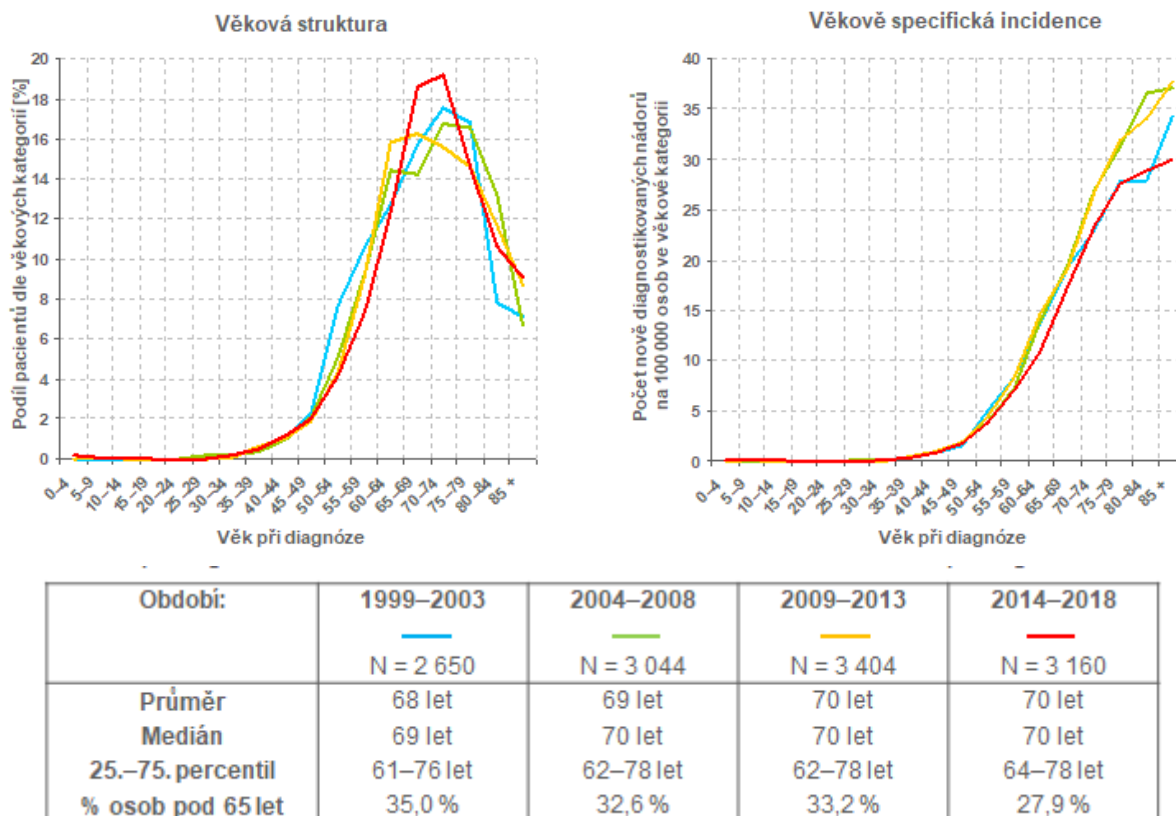
Monoklonální B-lymfocytóza je definována jako asymptomatický stav s klonální expanzí B-lymfocytů, jejichž početní zastoupení je pod mezí kritéria stanovení diagnózy CLL. Při stanovení krevního obrazu na automatickém hematologickém analyzátoru nemusí být patrné početní abnormality, které by vedly k další analýze periferní krve. Nicméně moderní automatické hematologické analyzátory (např. námi využívaný analyzátor firmy Sysmex) mají funkci hlášení při podezření na suspektní výskyt abnormálních, ve smyslu patologických, lymfocytů, tzv. hlášení Abn Lympho?. Hlášení suspektní přítomnosti patologických lymfocytů je zajištěno prostřednictvím speciálního WPC (WPC – White pathological cell) kanálu hematologického analyzátoru. Analyzovaný krevní obraz s takovým hlášením je na OLM MOÚ podroben další analýze, a to mikroskopickému vyšetření nátěru periferní krve, případně došetření periferní krve metodou průtokové cytometrie. Průtokový cytometr může zachytit i nízký počet klonálních B-lymfocytů. Na základě stanovení imunofenotypu lymfocytů metodou průtokové cytometrie lze říci, zda imunofenotyp klonálních B-lymfocytů odpovídá imunofenotypu buněk CLL, atypické CLL či je imunofenotyp B-lymfocytů blíže jinému lymfoproliferativnímu onemocnění. Data pro senzitivitu (89 %) a specifitu (97 %) WPC kanálu, konkrétně hlášení Abn Lympho? byla publikována v diplomové práci Sládkové (2019), která byla vypracována na Oddělení laboratorní medicíny Masarykova onkologického ústavu.

10.2 Hodnocení závislosti onemocnění CLL, MBL na věku a pohlaví

Chronická lymfatická leukémie je onemocnění, které patří k nejčastějším onemocněním krvetvorné tkáně. V České republice byla incidence CLL v letech 2014–2018 vyšší u mužů (muži 7/100 000 obyvatel, ženy 5/100 000 obyvatel) (Národní onkologický registr – ÚZIS ČR). Incidence onemocnění CLL má poměrně stagnující trend, zatímco prevalence onemocnění CLL roste, meziroční změna v období 2014–2018 je 3 % (hodnocena na základě lineárního trendu). K 31. 12. 2018 žilo v České republice 4 878 s tímto onemocněním (46/100 000 osob).

Imunofenotypizace lymfocytů byla provedena u kontrolní skupiny (100 osob), CLL/MBL skupiny (50 osob). Ve skupině CLL/MBL byla u 37 osob stanovena diagnóza CLL, u 13 osob MBL. Medián věku jedinců s onemocněním CLL v době stanovení diagnózy byl 71 let (IQR 65, 76) u MBL 72 let (IQR 64, 77). Medián věku skupiny CLL/MBL přibližně koreluje s daty Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS), který uvádí medián věku pacientů v době stanovení diagnózy CLL v období 2014–2018 70 let (IQR 64, 78). U jedné pacientky bylo diagnostikováno onemocnění CLL v již 37 letech (diagnóza solidního tumoru až o 23 let později), což je hodnota výrazně vzdálená od mediánu a nejedná se o častý případ, vycházím-li z dat získaných pro tuto práci. U této ženy byla z 5 testovaných polymorfizmů ve 4 případech (rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985) v genotypu zastoupena alespoň jedna riziková alela. Ve skupině CLL/MBL byla tedy celkově u 1 pacienta diagnostikována CLL ve velmi nízkém věku (pod 50 let), MBL u 1 pacienta (42 let). U pacienta s laboratorním záchytem MBL ve věku 42 let byla zastoupena riziková alela ve 3 případech z pěti testovaných SNP (rs7176508, rs872071, rs13397985).

Ve skupině CLL/MBL bylo celkem 50 pacientů s diagnózou CLL (37) nebo MBL (13). U obou zmíněných diagnóz je výrazným faktorem v době stanovení diagnózy věk. Ve věkové kategorii ≥ 71 let je 4,9× vyšší šance výskytu onemocnění CLL nebo MBL oproti věkové kategorii ≤ 70 let. Zvyšující se prevalenci CLL, MBL v závislosti na věku popisují i jiné publikace – Shim et al. (2010). Sládková (2019) uvádí u osob nad 60 let je výrazné zvýšení prevalence o více jak 5 %. Také data za období 2014–2018 z ÚZIS popisují stoupající trend incidence CLL v závislosti na věku pacienta (Obrázek 39).



Obrázek 39: Incidence CLL v závislosti na věku (Národní onkologický registr – ÚZIS ČR)

Grafické zpracování v levé části zobrazuje procentuální zastoupení pacientů s CLL v České republice z celkového počtu nemocných. Graf v pravé části zobrazuje počet pacientů s nově diagnostikovaným onemocněním CLL na 100 000 obyvatel v České republice. Medián věku se od roku 1999 příliš nemění. Podíl pacientů je výrazně vyšší se stoupajícím věkem, podíl pacientů po 65 let je téměř 30 %.

Medián délky onemocnění CLL je u pacientů v testovaném souboru jedinců k současnému roku (03/2022) stanovený na 6 let, u 4 případů bylo zaznamenáno úmrtí. U všech 4 případů byl diagnostikován solidní tumor a CLL. V případě současně diagnostikované MBL a solidního tumoru bylo zaznamenáno úmrtí u jednoho pacienta (příčinou úmrtí byla progresse onemocnění solidním tumorem). Medián přežití u skupiny pacientů CLL/MBL však nelze interpretovat či porovnat s jinými údaji v důsledku nedostatečného počtu případů CLL/MBL diagnostikovaných dříve než před 10 lety anebo z důvodu ovlivnění délky života vlivem sekundární malignity (solidní tumor). Nicméně data českého CLL registru uvádějí medián přežití pacientů s diagnózou CLL přibližně 10 let (KDP 2020).

Nebyl prokázán vliv pohlaví na rozvoj CLL ve skupině CLL/MBL. Na rozdíl od Sládkové (2019), kde byla prevalence MBL i CLL v rámci prospektivní studie (kontrolní populace a populace pacientů se solidním tumorem) u mužů v obou sledovaných souborech vyšší ($p = 0,0273$). I v mojí práci však bylo

procentuální zastoupení mužů ve skupině CLL/MBL vyšší (62 %). Procentuální zastoupení mužů a žen s diagnózou CLL nebo MBL přibližně odpovídá zastoupení pohlaví v celém souboru CLL/MBL. Hodnocení závislosti na pohlaví však může být v mém studovaném souboru ovlivněno spektrem studovaných pacientů s CLL/MLB: například většinu skupiny tvoří pacienti s nádory, u nichž je nejčastěji zastoupenou diagnózou karcinom prsu, jehož incidence je významně vyšší u žen než u mužů apod.

10.3 CLL a solidní malignita

Zvýšená výskyt CLL nebo MBL je obecně popisován u pacientů se solidními malignitami. V práci Sládkové (2019) byl porovnáván záchyt onemocnění CLL v populaci pacientů s diagnostikovaným solidním tumorem (v době diagnózy solidního tumoru bez léčby, tj. první návštěva v MOÚ) proti jedincům účastnících se preventivního programu MOU (referenční skupina). Laboratorní záchyt B-lymfoproliferace či MBL byl tedy v době již rozvinuté solidní malignity (prozatím neléčené), a tím pádem B-lymfoproliferace či MBL prokazatelně nevznikly v důsledku působení léčby onkologického onemocnění. Stejně tak nedošlo k rozvoji solidního tumoru v důsledku působení léčby B-lymfoproliferace. Byl zaznamenán vyšší výskyt B-lymfoproliferací u pacientů se solidním nádorem (7 %) i MBL (5 %) v porovnání se záchytem zmíněného onemocnění v referenční skupině (2 %). Tyto závěry korespondují s výsledky také jiných studií, které potvrzují vyšší riziko vzniku CLL u osob s diagnostikovanou jinou solidní malignitou (Manusow et al. 1975), (Manusow and Weirnerman 1975), (Tsimberidou et al., 2009), (van den Broek et al. 2014).

V této práci byla u třech pacientů primární malignitou CLL, nicméně pro nízký počet takových případů a zejména z důvodu způsobu výběru pacientů (primárně pacienti MOÚ) nelze hodnotit trend u pacientů s diagnostikovanou CLL k rozvoji sekundární, solidní malignity jako to uvedli ve své studii například Schöllkopf et al. (2007).

10.4 Hodnocení rizikových faktorů vývoje MBL v CLL

MBL s vysokým počtem klonálních B-lymfocytů v periferní krvi ($> 0,5 \times 10^9/l$) obvykle progreduje do CLL. Strati et al. (2015) uvádí, že progresi MBL do CLL lze očekávat u 1–2 % pacientů ročně. V našem případě bylo všech 13 jedinců ve skupině CLL/MBL s onemocněním MBL zařazeno do skupiny s vysokým počtem B-lymfocytů. U 8 pacientů došlo po určité době k progresi onemocnění MBL do CLL. Medián počtu let progresi MBL do CLL je u těchto pacientů je 2 roky. U 4 pacientů prozatím nedošlo k progresi onemocnění v CLL (údaj k 03/2022, počet let od doby diagnózy MBL se pohyboval 0,5–7). U jednoho pacienta není k dispozici další vyšetření periferní krve, a tak není možné vývoj MBL hodnotit. Průměrný počet let od doby stanovení diagnózy solidní malignity do doby laboratorního záchytu MBL je v naší CLL/MBL skupině 7–8 let. Strati et al. (2015) popisuje u pacientů s MBL s vysokým počtem klonálních B-lymfocytů riziko rozvoje sekundární malignity, což z důvodu způsobu výběru pacientů (primárně pacienti MOÚ) potvrdit nemůžu. Avšak ze skupiny 13 pacientů s MBL bylo u 12 dříve diagnostikováno jiné onkologické onemocnění.

V rámci této práce bylo testováno zastoupení genotypů u kontrolní skupiny a u pacientů s MBL. Výsledky statistického vyhodnocení byly totožné s pacienty, u kterých bylo diagnostikováno onemocnění CLL. Při porovnání genotypů a výskytu rizikové alely tedy nebyl rozdíl ve výsledných genotypech ani výskytu rizikové alely mezi pacienty s CLL a MBL statisticky významný. Předpokládáme, i s ohledem na výsledky jiných studií jako Crowther-Swanepoel et al. (2010), že MBL lze označit jako prekurzor CLL a u testovaných SNP tak nebude mít vliv, zda má pacient diagnostikovanou MBL nebo CLL. Nicméně toto tvrzení bude nutné ještě doplnit dalšími studii s více případy MBL. Hodnocení zastoupení genotypů u jedinců s MBL a skupinou referenční popisuje také Crowther-Swanepoel et al. (2010). Genetickou predispozici k MBL, stejně jako tomu je u CLL, prokázali ve studii, ve které bylo vyšetřováno 9 SNP, z nichž 6 SNP bylo charakterizováno také zvýšeným rizikem CLL (rs17483466, rs13397985, rs757978, rs872071, rs2456449, rs735665). V mojí práci byl jako statisticky významný zhodnocený SNP rs735665 ($p = 0,007$, Tabulka 11). Ostatní testované SNP se v této práci neukázaly jako statisticky významné. Do jisté míry to může být způsobeno nižším počtem případů CLL/MBL oproti jiným studiím.

Tabulka 11: Vliv polymorfizmů na riziko vývoje MBL

Výsledky MOÚ 2022					
SNP	rs17483466	rs735665	rs7176508	rs872071	rs13397985
OR	0,96	2,81	0,86	0,88	0,92
p-hodnota	0,926	0,007	0,770	0,729	0,825
Crowther-Swanepoel et al. 2010					
SNP	rs17483466	rs735665	rs7176508	rs872071	rs13397985
OR	1,27	1,63	nebyl	1,27	1,40
p-hodnota	0,02	$6,86 \times 10^{-6}$	testován	$7,75 \times 10^{-3}$	$1,72 \times 10^{-3}$

10.5 Asociace polymorfizmů rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985 s onemocněním CLL

Chronická lymfatická leukémie je onemocněním staršího věku s odlišným klinickým průběhem a také onemocněním, u kterého celkový stav jedince je významně ovlivněný přidruženými chorobami. Chronická lymfatická leukémie je choroba, u které nebyl jednoznačně prokázán vliv zevních faktorů, které by se podílely na vzniku onemocnění provázeném klonální expanzí B-lymfocytů. Podezření na výskyt onemocnění u pacienta je často vysloveno na základě záchytu zvýšeného počtu lymfocytů v periferní krvi, zjištěného v rámci standardní prohlídky u lékaře při stanovení krevního obrazu. Lymfocytóza v periferní krvi je způsobena klonální expanzí B-lymfocytů.

Opakovaně zveřejněné výsledky studií hovoří o vzniku onemocnění CLL na genetickém podkladu. Na vzniku onemocnění se pravděpodobně podílejí změny na chromozomální úrovni nebo genetické polymorfizmy, které byly předmětem analýzy této práce.

Zastoupení jednotlivých alel, genotypů v testovaném souboru jedinců odpovídá datům uvedeným v databázi SNP NCBI (National Center for Biotechnology Information) u Evropanů (Tabulka 12). Procentuální zastoupení alel v kontrolní skupině přibližně odpovídá zastoupení alel ve srovnání s databází SNP NCBI, přičemž v našem testovaném souboru je výrazně nižší počet kontrol.

Tabulka 12: Porovnání zastoupení alel v testovaném souboru s publikovanými daty

SNP	Zastoupení alel (náš soubor)		Soubory	Počet n	Zastoupení alel (Evropa)		Počet n
	A	G			A	G	
rs17483466	A	G			A	G	
	79 %	21 %	Kontrolní skupina	100	79 %	21 %	303164
	81 %	19 %	CLL/MBL skupina	50			
rs735665	G	A			G	A	
	78 %	22 %	Kontrolní skupina	100	81 %	19 %	299520
	63 %	37 %	CLL/MBL skupina	50			
rs872071	A	G			A	G	
	49 %	51 %	Kontrolní skupina	100	50 %	50 %	297880
	47 %	53 %	CLL/MBL skupina	50			
rs7176508	A	G			A	G	
	52 %	48 %	Kontrolní skupina	100	39 %	61 %	251688
	48 %	52 %	CLL/MBL skupina	50			
rs13397985	T	G			T	G	
	76 %	24 %	Kontrolní skupina	100	82 %	18 %	261302
	76 %	24 %	CLL/MBL skupina	50			

V levé části tabulky jsou uvedeny jednotlivé polymorfizmy, zastoupení alel u kontrolní skupiny, skupiny CLL/MBL a v pravé části zastoupení alel u Evropanů. Procentuální zastoupení alel kontrolní skupiny odpovídá zastoupení alel u populace v Evropě. Pro srovnání je v tabulce uvedeno také procentuální zastoupení alel u jedinců ze skupiny CLL/MBL. Informace k zastoupení alel u evropské populace je převzato z NCBI. (NCBI – rs17483466 [online], NCBI – rs735665 [online], NCBI – rs7176508 [online], NCBI – rs872071 [online], NCBI – rs13397985 [online])

U jedinců v obou skupinách byly studované polymorfizmy z DNA, která byla izolovaná z periferní krve, v některých případech ze séra. Do kontrolní skupiny byli kromě jedinců z preventivního programu MOÚ řazeni jedinci s nově diagnostikovaným solidním tumorem. Cílem bylo eliminovat výsledky studie zatížené chybou v podobě nevhodně zvolené kontrolní populace, tedy s předpokladem, že studované polymorfizmy by neměly být asociovány s výskytem solidní malignity nebo s jinými přidruženými aspekty. Studováním polymorfizmů z DNA izolované z periferní krve a jejich asociací s onemocněním CLL, případně MBL se zabývala již v minulosti řada zahraničních studií. Některé publikace popisují zvýšené riziko CLL na familiárním podkladu, zejména u prvostupňových příbuzných, jak uvádí například Goldin et al. (2004) a Sellick et al. (2007). Toto tvrzení však nebylo předmětem naší práce. Pacienti v testovaném souboru s onemocněním CLL nebo MBL nebyli v blízkém příbuzenském vztahu. Byl testován vliv variant v DNA na vznik CLL či klonální expanzi B-lymfocytů, avšak pod hranicí početních kritérií CLL. Tyto případy jsou označeny pod pojmem monoklonální B-lymfocytóza. V několika asociačních studiích byl prokázán vliv změn v DNA na vznik onemocnění CLL. Některé další

polymorfizmy, u kterých autoři prokázali asociaci mezi konkrétní variantou a CLL nebo MBL nebyly v rámci této práce vyšetřovány. Některé výsledky této práce se shodují s výsledky již publikovanými. U polymorfizmu rs735665 se prokázalo zvýšené riziko (OR 2,81, adjustováno na věk) k rozvoji CLL nebo MBL. OR byla počítána pro celý soubor CLL/MBL skupiny, nikoliv pro každou diagnózu samostatně. U některých testovaných polymorfizmů (rs17483466, rs735665, rs13397985, rs7176508) se jeví riziko rozvoje CLL jako zvýšené s rostoucím počtem rizikových alel, avšak pouze u rs735665 je riziko rozvoje CLL prokazatelně vyšší (GA: $p = 0,030$, AA: $p = 0,007$). Asociace polymorfizmu rs735665 se zvýšeným rizikem rozvoje CLL byla prokázána i v dalších studiích. Crowther-Swanepoel et al. 2010 popisuje také zvyšující se riziko rozvoje CLL s rostoucím počtem rizikových alel v genotypu a také stejně jako výsledky z MOÚ neprokazují asociaci rs17483466 se zvýšeným rizikem rozvoje onemocněním CLL. Naproti tomu výsledky jiných studií Slager et al. 2010, Di Bernardo et al. 2008 hovoří o vztahu mezi CLL a všemi SNP testovanými v naší laboratoři (rs17483466, rs735665, rs7176508, rs872071, rs13397985). Broderick et al. (2008) dále popisují kromě asociace rs872071 s CLL také asociaci zvýšeného rizika varianty genu IRF4 (rs872071) s Hodgkinovým lymfomem (OR 1,21, $p = 0,009$). Přehled studovaných polymorfizmů u různých studií (včetně MOÚ studie) jsou uvedeny níže (Tabulka 13).

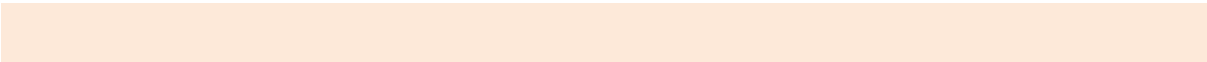
Tabulka 13: Vliv polymorfizmů na riziko vývoje CLL

Výsledky MOÚ 2022 (soubor: 50 případů, 100 kontrol)					
SNP	rs17483466	rs735665	rs7176508	rs872071	rs13397985
OR	0,96	2,81	0,86	0,88	0,92
95% CI	0,44–2,06	1,34–6,1	0,38–2,02	0,37–2,13	0,43–1,94
p-hodnota	0,926	0,007	0,770	0,729	0,825
Crowther-Swanepoel et al. 2010: Španělsko (soubor: 424 případů, 450 kontrol)					
SNP	rs17483466	rs735665	rs7176508	rs872071	rs13397985
OR	1,10	1,33	1,21	1,33	1,19
95% CI	0,86–1,31	1,05–1,69	1,0–1,47	1,09–1,62	0,95–1,50
p-hodnota	0,58	0,02	0,06	0,01	0,13
Crowther-Swanepoel et al. 2010: Švédsko (soubor: 400 případů, 400 kontrol)					
SNP	rs17483466	rs735665	rs7176508	rs872071	rs13397985
OR	1,09	1,91	1,34	1,51	1,40
95% CI	0,85–1,40	1,50–2,44	1,10–1,63	1,24–1,84	1,08–1,80
p-hodnota	0,50	$1,16 \times 10^{-7}$	$3,07 \times 10^{-3}$	$3,80 \times 10^{-5}$	0,01
Slager et al. 2010 (soubor: 438 případů, 328 kontrol)					
SNP	rs17483466	rs735665	rs7176508	rs872071	rs13397985
OR	1,43	1,47	1,50	1,35	1,36
95% CI	1,11–1,85	1,14–1,89	1,19–1,90	1,02–1,78	1,04–1,79
p-hodnota	$6,30 \times 10^{-3}$	$2,80 \times 10^{-3}$	$6,20 \times 10^{-4}$	$3,70 \times 10^{-2}$	$2,40 \times 10^{-2}$
Di Bernardo et al. 2008 (soubor: 1529 případů, 3115 kontrol)					
SNP	rs17483466	rs735665	rs7176508	rs872071	rs13397985
p-hodnota	$2,36 \times 10^{-10}$	$3,78 \times 10^{-12}$	$4,54 \times 10^{-12}$	$1,91 \times 10^{-20}$	$5,40 \times 10^{-10}$

Výsledky studií popisují vztah mezi polymorfizmy a rizikem vývoje CLL. Jsou zde uvedeny výsledky studií zohledňující riziko vývoje CLL u evropské populace. U jednotlivých studií je v závorce uvedená velikost testovaného souboru, počet vzorků pacientů s CLL, tj. případů a počet pacientů bez diagnózy CLL, tj. kontrol. Výsledky testovaných SNP v rámci této práce, které oproti jiným studiím nepoukazují na vliv SNP v rozvoji CLL, mohou být způsobeny nižším počtem vzorků ve skupině CLL/MBL i kontrolní skupině.

Crowther-Swanepoel et al. 2010 analyzují samostatně švédskou a španělskou populaci. Asociace mezi genotypem a rizikem rozvoje CLL spolu přibližně korelují. Pro hodnocení asociace mezi genotypy testovaných rs17483466, rs13397985, rs872071, rs735665, rs7176508 a rs11083846 a rozvojem CLL však použili data kombinovaná (populace Švédska a Španělska), nicméně zveřejňují je i pro každou populaci zvlášť. Statisticky významnou asociaci s rizikem rozvoje CLL prokázali u 5 z 6 testovaných polymorfizmů, tj. rs13397985, rs872071, rs735665, rs7176508 a rs11083846. Pro rs17483466 nebyla prokázána asociace s CLL.

Slager et al. 2010 také provedli asociační studii, jejíž výsledky též podporují uplatnění SNP v patogenezi onemocnění CLL. Kromě již zmíněné asociace mezi rs17483466, rs735665, rs7176508,



rs872071, rs13397985 prokázali také asociaci rs9378805 (6p25). Locus 6p25 byl spojen s rizikem rozvoje CLL již při první GWAS studii (Slager et al. 2013).

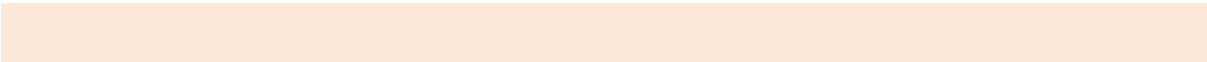
Di Bernardo et al. 2008 také ve své studii potvrdili asociaci rizika CLL a SNP již dříve identifikovaných (shodné se SNP testovanými v naší laboratoři).

11 Závěr

Vybraní pacienti byli na základě stanovení krevního obrazu, analýzy periferní krve pomocí průtokové cytometrie rozřazeni do skupin s cílem jednoznačně oddělit skupinu pacientů s diagnózou CLL nebo MBL a referenční populaci (50 jedinců z preventivního programu Masarykova onkologického ústavu a 50 pacientů se solidním tumorem s normálním imunofenotypem buněk periferní krve a bez předchozí protinádorové léčby). Skupina CLL/MBL zahrnovala vzorky 50 pacientů, u kterých byla naplněna diagnostická kritéria pro diagnózu CLL nebo MBL na základě zjištěné hodnoty lymfocytů při stanovení krevního obrazu a imunofenotypu lymfocytů, tzv. CLL/MBL skupina. Ve skupině CLL/MBL byl počet jedinců se solidním tumorem a CLL nebo MBL 39. 11 Jedinců ze skupiny CLL/MBL nemělo diagnostikovanou solidní malignitu (například pacienti s hypertenzí, benigní hyperplazie prostaty).

U pacientů v CLL/MBL skupině (50 osob) byl u všech pacientů stanovený imunofenotyp buněk odpovídající tzv. typické CLL. Takto jsou označeny klonální B-buňky s imunofenotypem CD5+ CD23+ CD20^{dim}. Pacienti byli na základě početních, klinických kritérií rozděleni na jedince s diagnózou CLL nebo MBL. Při hodnocení vyššího věku jedince, jako jednoho z rizikových faktorů pro vývoj CLL nebo MBL, byl pozorován vyšší výskyt onemocnění se zvyšujícím se věkem jedince. Procentuální zastoupení mužů ve skupině CLL/MBL bylo vyšší (62 %), ale na rozdíl od dříve publikované práce vypracované na OLM MOÚ, Sládková (2109), nebyla prokázána asociace onemocnění CLL, MBL s mužským pohlavím. MBL je označována jako prekurzor onemocnění CLL. Zejména pacienti s diagnózou MBL s vysokým počtem klonálních B-lymfocytů mohou často přecházet do onemocnění CLL, což bylo potvrzeno u více jak poloviny pacientů zařazených v této práci do skupiny pacientů s MBL s vysokým počtem klonálních B-lymfocytů. Pro nízký počet pacientů s MBL a žádným pacientem zařazeným do skupiny MBL s nízkým počtem klonálních B-lymfocytů v periferní krvi nelze však hodnotit či porovnat četnost těchto případů, které přecházejí/nepřecházejí do CLL. CLL je chronické lymfoproliferativní onemocnění a z důvodu deregulace imunitního systému může být organizmus pacientů dále často zatížený infekčním onemocněním, nebo například sekundárně se vyvíjejícím nádorovým onemocněním. Stejně tak je solidní nádorové onemocnění často provázeno následně diagnostikovanou CLL. Přesný mechanismus závislosti CLL/MBL a solidních malignit však není znám.

Cílem práce bylo získat další výsledky, které by pomohly k vyjasnění etiologie CLL/MBL, případně poukázaly na genetickou predispozici onemocnění a potvrdily či vyvrátily tak tvrzení získaná z dřívějších publikovaných studií. Přidanou hodnotou bylo zařazení pacientů se solidní malignitou, u nichž je prevalence tohoto onemocnění vyšší než v běžné populaci. Na základě výsledků této práce lze poukázat, že i zde pravděpodobně hraje významnou roli genetická predispozice (SNP) k CLL/MBL. Bylo porovnáno zastoupení alel, genotypů a výskyt rizikové alely u kontrolní a CLL/MBL skupiny. Testováním polymorfizmů se podařilo prokázat asociaci SNP (rs735665) s onemocněním CLL, MBL stejně jako tomu bylo v jiných studiích – Slager et al. 2010, Crowther-Swanepoel et al. 2010, Di Bernardo et al. 2008. U některých dalších testovaných polymorfizmů by snad bylo možné interpretovat zvýšené riziko k rozvoji CLL nebo MBL v korelaci se zvyšujícím se počtem rizikových alel (rs17483466 genotyp GG; rs735665 genotyp AA, rs7176508 genotyp AA, rs13397985 genotyp GG). Tyto výsledky však nebyly statisticky signifikantní.



Vyšetřování genetických polymorfizmů není běžnou součástí praxe pro diagnostiku onemocnění CLL nebo MBL. Při získání dalších výsledků, validaci již publikovaných polymorfizmů bude však možné lépe pochopit patogenezi onemocnění CLL i MBL, případně výsledky později propojit s klinickým stavem vyšetřovaných pacientů a využít tak jejich identifikaci například k nastavení nových prognostických faktorů CLL.

Seznam pojmů a zkratek

Zkratka	Význam anglicky	Význam česky
A	Adenine	Adenin
APC AF750	Allophycocyanin-Alexa Fluor 750	
APC	Allophycocyanin	
Bcl-2	B-cell lymphoma	
CD	Cluster of differentiation	Diferenciační antigen
CI	Confidence interval	Interval spolehlivosti
CLL	Chronic Lymphotic Leukemia	Chronická lymfatická leukemie
Del	Deletion	Delece
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
FISH	Fluorescence in situ hybridization	Fluorescenční in situ hybridizace
FITC	Fluorescein isothiocyanate	
G	Guanine	Guanin
GWAS	Genome-wide association study	Celogenomová asociační studie
IQR	Interquartile range	Mezikvartilové rozpětí
KrO	Krome Orange	
MBL	Monoclonal B lymphocytosis	Monoklonální B lymfocytóza

MOÚ	Masaryk Memorial Cancer Institute Masarykův onkologický ústav
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	Natural Killer Přirození zabíječi
OLM	Department of Laboratory Medicine Oddělení laboratorní medicíny
OR	Odds ratio Poměr šancí
PB	Pacific Blue
PBS	Phosphate-Buffered Saline Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PC5.5	Phycoerythrin-Cyanine 5.5
PC7	Phycoerythrin-Cyanine 7
PCR	Polymerase chain reaction Polymerázová řetězová reakce
PE	Phycoerythrin
SLL	Small Lymphotic Leukemia Lymfom z malých lymfocytů
SNP	Single nucleotide polymorphisms Jednonukleotidový polymorfismus
T	Thymine Thymin
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
WHO	World Health Organization Světová zdravotnická organizace

Použité zdroje

Abruzzo LV, Herling CD, Calin GA, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. *Haematologica*. 2018; 103(12): 2069–2078. doi:10.3324/haematol.2018.190132

American Society of Clinical Oncology. Leukemia - Chronic Lymphocytic - CLL: Diagnosis [online]. Poslední revize 10. 2017. [cit. 2021-08-03]. Dostupné z: www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/diagnosis.

Barretina J, Juncà J, Llano A, et al. CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease. *Ann Hematol*. 2003; 82: 500–505. <https://doi.org/10.1007/s00277-003-0679-0>

Beckman Coulter – Anti-FMC7-FITC [online]. Poslední revize 1. 10. 2021 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=FMC7-fitc&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – Anti-Kappa-FITC [online]. Poslední revize 1. 10. 2021 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=B49178&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – Anti-Lambda-PE [online]. Poslední revize 1. 10. 2021 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=B49174&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – CD19-FITC [online]. Poslední revize 1. 10. 2021 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=A07768&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – CD200-APC-Alexa Fluor 750 [online]. Poslední revize 1. 9. 2019 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=B43301&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – CD20-APC-Alexa Fluor 750 [online]. Poslední revize 1. 11. 2021 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=B49209&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – CD23-APC [online]. Poslední revize 17. 8. 2020 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=A69964&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – CD45-Krome Orange [online]. Poslední revize 1. 11. 2021 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=B36294&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – CD5-Pacific Blue [online]. Poslední revize 1. 9. 2019 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=A82790&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – CD79b-PE [online]. Poslední revize 1. 10. 2021 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=IM1612&t=coveo-tab-techdocs>

Beckman Coulter – Instruction For Use [online]. Poslední revize 30. 9. 2021 [cit, 2022-03-10]. Dostupné z: <https://www.mybeckman.cz/search#q=navios&t=coveo-tab-techdocs>

Beiggi S, Johnston JB, Seftel MD, et al. Increased risk of second malignancies in chronic lymphocytic leukaemia patients as compared with follicular lymphoma patients: a Canadian population-based study. *Br J Cancer*. 2013; 109 (5): 1287–1290. doi:10.1038/bjc.2013.381

BELADA D. Udržovací léčba rituximabem u ne-Hodgkinových lymfomů - možnosti v roce 2010. *Onkologie*. 2010; 4: 196–201.

Beránek M. *Molekulární Genetika Pro Bioanalytiky*. Praha: Karolinum; 2016.

Biassoni R, Raso A. Quantitative Real-Time Pcr. New York; 2014. Biassoni R, Raso A. *Quantitative Real-Time Pcr: Methods And Protocols*. Second Edition. Humana Press; 2020.

Brejcha M. News in the Supportive Care of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Klinická onkologie*. 2015; 28(3): 50–54. doi:http://dx.doi.org/10.14735/amko20153S50

Broderick P, Cunningham D, Vijayakrishnan J, et al. IRF4 polymorphism rs872071 and risk of Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2010; 148(3): 413–415. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07946.x

Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. 2000; 46(8 Pt 2): 1221–1229.

Buggins AG, Patten PE, Richards J, et al. Tumor-derived IL-6 may contribute to the immunological defect in CLL. *Leukemia*. 2008; 22(5): 1084–1087. doi:10.1038/sj.leu.2405015

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(39): 13944–13949. doi:10.1073/pnas.0506654102

Crowther-Swanepoel D, Corre T, Lloyd A, et al. Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood*. 2010; 116(26): 5957–5960. doi:10.1182/blood-2010-07-294975

Crowther-Swanepoel D, Mansouri M, Enjuanes A, et al. Verification that common variation at 2q37.1, 6p25.3, 11q24.1, 15q23, and 19q13.32 influences chronic lymphocytic leukaemia risk. *Br J Haematol*. 2010; 150(4): 473–479. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08270.x

D'Arena G, Musto P. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Transl Med UniSa*. 2014; 8:75–79.

Dasanu CA, Alexandrescu DT. Risk for second nonlymphoid neoplasms in chronic lymphocytic leukemia. *MedGenMed*. 2007; 9(4): 35.

Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008; 450–456. doi:10.1182/asheducation-2008.1.450

Demlova R, Mrkvicova M, Sterba J, et al. Augmenting clinical interpretability of thiopurine methyltransferase laboratory evaluation. *Oncology* 2014; 86(3): 152–158.

Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2008; 40(10): 1204–1210. doi:10.1038/ng.219

Dlouhý Martin – Robotika [online]. Poslední revize 28. 11. 2005 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://robotika.cz/articles/gerda/cs>

Doubek M, Folber F, Janíková A, et al. *Hematologická onkologie – leukemie a lymfomy v humánní medicíně.* 2012. ISBN 978-80-7305-621-6

George TI. Malignant or benign leukocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012; 475–484. doi:10.1182/asheducation-2012.1.475

Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood.* 2004; 104(6):1850–1854. doi:10.1182/blood-2004-01-0341

Hadrabová M. Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie.* 2015; 9(3): 107–111.

Haferlach T, Ulrike B, Harald T, et al. *Kapesní Atlas Hematologie: Překlad 6., Přepřacovaného Vydání.* Praha: Grada; 2014.

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 2018; 131(25): 2745–2760. doi:10.1182/blood-2017-09-806398

Hamad H, Mangla A. Lymphocytosis. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; April 6, 2021.

Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br Med Bull.* 2008; 87: 49–62. doi:10.1093/bmb/ldn034

Itälä M, Vainio O, Remes K. Functional abnormalities in granulocytes predict susceptibility to bacterial infections in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 1996; 57(1): 46–53. doi:10.1111/j.1600-0609.1996.tb00489.x

Delgado J, Nadeu F, Colomer D, et al. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica.* 2020; 105(9): 2205–2217. doi:10.3324/haematol.2019.236000

Kačírková P, Campr V. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně.* Praha: Grada; 2007.

Kay NE, Zarlring JM. Impaired Natural Killer Activity in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated With a Deficiency of Azurophilic Cytoplasmic Granules in Putative NK Cells. *Blood*. 1987; 60(2): 305–309. doi:doi.org/10.1182/blood.V63.2.305.305

KDP [online]. Praha: ÚZIS ČR, 2020 [cit. 2022-3-10]. Dostupné z: <https://kdp.uzis.cz>.

Kikushige Y. Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*. 2020; 60(4): 146–158. doi:<https://doi.org/10.3960/jslrt.20036>

Klabusay M, Winkler J. *Flow cytometrie v onkologické hematologii*. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity [online] [cit. 27. 03. 2021]. Dostupný z WWW: <https://portal.med.muni.cz/clanek-21-flow-cytometrie-v-onkologicke-hematologii.html>.

Kleinstern G, Weinberg JB, Braggio E, et al. Polygenic risk score and risk of monoclonal B-cell lymphocytosis in caucasians and risk of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in African Americans. *Leukemia*. 2022; 36: 119–125. doi:10.1038/s41375-021-01344-9.

Lan Q, Au WY, Chanock S, et al. Genetic susceptibility for chronic lymphocytic leukemia among Chinese in Hong Kong. *Eur J Haematol*. 2010; 85(6): 492–495. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01518.x

Lin WY, Fordham SE, Sunter N, et al. Genome-wide association study identifies risk loci for progressive chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun*. 2021; 12(1): 665. doi:10.1038/s41467-020-20822-9

Litin SC, Nanda SJ. *Mayo Clinic Family Health Book*. 5th ed. USA: Mayo Clinic Press; 2018.

Lu W, Mehraj V, Vyboh K, et al. CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. *J Int AIDS Soc*. 2015; 18(1): 20052. doi:10.7448/IAS.18.1.20052

Maddocks S, Jenkins R. *Understanding Pcr*. 1st ed. © Academic Press; 2016.

Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, et al. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica*. 2013; 98(7): 1115–1123. doi:10.3324/haematol.2012.073080

Maitre E, Troussard X. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019; 32(3): 229–238. doi:10.1016/j.beha.2019.06.002

Manukyan G, Papajik T, Gajdos P, et al. Neutrophils in chronic lymphocytic leukemia are permanently activated and have functional defects. *Oncotarget*. 2017; 8(49): 84889–84901. doi:10.18632/oncotarget.20031

Manusow D, Weinerman BH. Subsequent neoplasia in chronic lymphocytic leukemia. *JAMA*. 1975; 232(3): 267–269.

Matsuda K. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Adv Clin Chem*. 2017; 80: 45–72. doi:10.1016/bs.acc.2016.11.002

McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018; 120(5): 1–11. doi:10.1002/cpim.40

Mitova R, Djambazov S, Slavchev G, et al. ASSESSMENT OF COMPARATIVE EFFECTIVENESS OF NEXT GENERATION SEQUENCING VERSUS STANDARD DIAGNOSTIC TESTS IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER. *Journal of Public Health*. 2020; 11(3): 72. doi:10.1016/j.jval.2020.08.400.

Mora A, Bosch R, Cuellar C, et al. CD200 is a useful marker in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019; 96(2): 143–148. doi:10.1002/cyto.b.21722

Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997; 108(4): 378–382. doi:10.1093/ajcp/108.4.378

Navrkalová V, Kantorová I, Jarošová M, et al. Molecular Prognostic Markers and Their Clinical Relevance in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Klinická onkologie*. 2015; 28(3): 3S6–3S15. doi:10.14735/amko20153S6

NCBI – rs13397985 [online]. Poslední revize 09. 04. 2021 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs13397985>

NCBI – rs17483466 [online]. Poslední revize 09. 04. 2021 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs17483466>

NCBI – rs7176508 [online]. Poslední revize 09. 04. 2021 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7176508>

NCBI – rs735665 [online]. Poslední revize 09. 04. 2021 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs735665>

NCBI – rs872071 [online]. Poslední revize 09. 04. 2021 [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs872071>

Ormerod MG. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. Third Edition. Oxford; 2000.

Ormerod MG. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. Second Edition. Oxford; 1994.

Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2009; 33(9): 1212–1216. doi:10.1016/j.leukres.2009.01.017

Penka M, Tesařová E. *Hematologie a transfuzní lékařství.* Praha: Grada; 2011.

Pilatova K, Mrkvicova M, Zdrzilova-Dubska L, et al. Detection of DPYD*2A allele in dihydropyrimidine dehydrogenase gene: perspective for fluoropyrimidine-treated patients. *Folia Mendeliana.* 2013; 49(2): 75–80.

Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int.* 2014; 435983. doi:10.1155/2014/435983

Rahman M. *Introduction to flow cytometry.* USA, Serotec Inc; 2016.

Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991; 60(2): 190–208. doi:10.1016/0090-1229(91)90063-g

Risch N, Merikangas K. The Future of Genetic Studies of Complex Human Diseases. *Science.* 1996; 273: 1516–1517.

Roche – LightCycler [online]. Poslední revize 10.2016 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/b468c7ceb58ee6116a9e00215a9b3428?countryIsoCode=cz>

Roche – MAGNA Pure [online]. Poslední revize 02.2021 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/66e2e48b-8f7a-ec110f91005056a71a5d?countryIsoCode=cz>

Sellick GS, Goldin LR, Wild RW, et al. A high-density SNP genome-wide linkage search of 206 families identifies susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007; 110(9): 3326–3333. doi:10.1182/blood-2007-05-091561

Shapiro MH. *Practical Flow Cytometry.* 4th Edition. USA: Wiley & Sons, Incorporated, John; 2003.

Sille FCM, Thomas R, Smith MT, et al. Post-GWAS Functional Characterization of Susceptibility Variants for Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE.* 2012; 7(1): 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0029632

Shim YK, Middleton DC, Caporaso NE, et al. Prevalence of monoclonal B-cell lymphocytosis: a systematic review. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010; 78(1): 10–18. doi:10.1002/cyto.b.20538

Schöllkopf C, Rosendahl D, Rostgaard K, et al. Risk of second cancer after chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer.* 2007; 121(1): 151–156. doi:10.1002/ijc.22672

Sládková M. Monoklonální B-lymfocytóza. *Diplomová práce.* Ústav biochemie Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, 2019; 87+17 stran.

Slager SL, Caporaso NE, de Sanjose S, et al. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2013; 50(4): 296–302. doi:10.1053/j.seminhematol.2013.09.007

Slager SL, Goldin LR, Strom SS, et al. Genetic susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(4): 1098–1102. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-1217

Smolej L, Špaček M, Pospíšilová Š, et al. Doporučení Pro Diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie (CLL) 2021. *Doporučení České skupiny pro chronickou lymfocytární leukemii, 2021*; 1–32.

Spacek M, Karban J, Radek M, et al. CD200 Expression Improves Differential Diagnosis Between Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma. *Blood.* 2014; 124(21): 5637-5637. doi:10.1182/blood.V124.21.5637.5637.

Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood.* 2015; 126(4): 454–462. doi:10.1182/blood-2015-02-585059

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016; 127(20): 2375–2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569

Špička, I. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie.* Praha: Galén, 2005. 128 s. ISBN 80-7262-330-3.

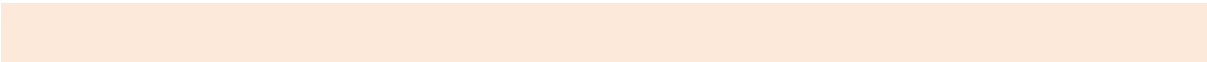
Ting YS, Smith SABC, Brown DA, et al. CD200 is a useful diagnostic marker for identifying atypical chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. *Int J Lab Hematol.* 2018; 40(5): 533–539. doi:10.1111/ijlh.12857

Tsimberidou AM, Wen S, McLaughlin P, et al. Other malignancies in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27(6): 904–910. doi:10.1200/JCO.2008.17.5398

Urbaniak M, Iskierka-Jażdżewska E, Majchrzak A, et al. Atypical immunophenotype of chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol Pol* 2022; 53(1): 48–52. doi:10.5603/AHP.a2021.0096

Národní onkologický registr – ÚZIS ČR [online]. Poslední revize 12.2018 [cit. 2022-04-04] Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=registry-sber-dat--narodni-zdravotni-registry--narodnionkologicky-registr>

van den Broek EC, Liu L, Posthuma EF, et al. Increased risk of chronic lymphocytic leukaemia among cancer survivors in the Netherlands: increased detection, causal factors or both?. *Ann Hematol.* 2014; 93(1): 157–162. doi:10.1007/s00277-013-1929-4



Zemanová Z, Michalová K, Březinová J. Význam cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy v diagnostice hematologických malignit v době nových sekvenačních technik. *Časopis lékařů českých*. 2019; 158(1): 22–27.

Ziegler A, Van Steen K, Wellek S. Investigating Hardy-Weinberg equilibrium in case-control or cohort studies or meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 128(1): 197–201. doi:10.1007/s10549-010-1295-z