

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



MUDr. Adéla Berková

Přínos molekulárně genetických a cytogenetických analýz k diagnostice a predikci léčebné odpovědi u pacientů s non-Hodgkinskými lymfomy

The role of molecular genetic and cytogenetic analyses in the diagnosis and prediction of treatment response in patients with non-Hodgkin lymphomas

Disertační práce

Školitelé:

Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne.....

Adéla Berková

Identifikační záznam:

BERKOVÁ, Adéla. *Přínos molekulárně genetických a cytogenetických analýz k diagnostice a predikci léčebné odpovědi u pacientů s non-Hodgkinskými lymfomy. [The role of molecular genetic and cytogenetic analyses in the diagnosis and prediction of treatment response in patients with non-Hodgkin lymphomas]*. Praha, 2014. 92 s., 6 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Centrum nádorové cytogenetiky ÚLBLD. Školitel Zemanová, Zuzana.

Na tomto místě bych ráda poděkovala mým školitelům, doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. a prof. MUDr. Marku Trněnému, CSc. za odborné vedení, řadu konzultací, trpělivost a celkovou podporu, jíž si nesmírně vážím, a to nejen při zpracovávání disertační práce.

Děkuji také prof. Ing. Michalové, DrSc. za možnost vypracovat tuto práci ve špičkově vybavené, akreditované laboratoři, a RNDr. Březinové, Ph.D. za vlídnost a řadu cenných rad. Celému kolektivu Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LFUK a Cytogenetického oddělení ÚHKKT děkuji za perfektní práci a příjemné pracovní prostředí.

Rovněž velmi děkuji celému kolektivu Ústavu patologie VFN a 1.LFUK a především MUDr. Janu Stříteskému, CSc. za nezapomenutelné konzultace, stejně jako za obdivuhodnou, poctivou práci a úsměv.

MUDr. Jiřímu Schwarzovi, CSc. velmi děkuji za spolupráci, podporu a kritické čtení každé mé práce. MUDr. Robertu Pytlíkovi děkuji za důvěru a podporu prakticky od začátku postgraduálního studia a MUDr. Kateřině Benešové, CSc. velmi děkuji za pomoc. Děkuji všem lékařům 1. interní kliniky VFN a 1.LFUK za spolupráci.

Za zásadní konzultace ve statistice děkuji RNDr. Janu Mužíkovi, Ph.D., za zpracování statistických dat děkuji také Ing. Dohnalové.

V neposlední řadě děkuji mým úžasným rodičům – tatínkovi Karlovi a mamince Marii za lásku a podporu v každé situaci, a milovaným dětičkám – synovci Matýskovi a neteřím Jůlince a Johance, za nový rozměr lásky a radosti. Děkuji celé své rodině a Bohu.

Abstrakt:

Maligní lymfoproliferace zahrnují vysoce heterogenní skupinu nádorů vycházejících z lymfocytů, tj. lymfomů (Non-Hodgkinových – NHL, i Hodgkinova), leukémií, mnohočetného myelomu a dalších. V současnosti je známa řada chromosomových aberací jak s diagnostickým, tak prognostickým významem, což zařadilo molekulárně cytogenetické analýzy genomu nádorových buněk mezi důležitá vyšetření. Disertace se věnuje především chronické lymfocytární leukémii (CLL), která patří mezi periferní B lymfoproliferace a je nejčastějším typem leukémie. Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) jsme vyšetřovali přítomnost čtyř nejčastějších aberací (delece 13q14, delece genu *ATM* a *TP53* a trisomie 12), doplněnou u části pacientů o detekci aberací genu *IgH*, a porovnali jsme nálezy s dalšími faktory a klinickými charakteristikami.

Práce ukazuje, že vyšetření klasického karyotypu je relativně málo relevantní. Metoda FISH byla pro záchyt aberací u CLL mnohem přínosnější. Přítomnost žádné ze čtyř zmíněných aberací není pro CLL specifická, má však prognostický význam, zejména delece *TP53*. Detekce některých translokací *IgH* genu je nepostradatelná v diferenciální diagnostice CLL a dalších NHL (velkobuněčného, folikulárního, Burkittova lymfomu, lymfomu z buněk pláštěvé zóny).

Věnovali jsme se potvrzení významu jednotlivých aberací u CLL a naše výsledky potvrdily význam prognostických hierarchických skupin. Příznivou prognózu dle hodnocení celkového přežití měly normální nálezy a záchyt delece 13q (bez jiné aberace), střední trisomie 12, a nejhorší prognózu delece genů *ATM* a *TP53*.

Velká část disertace je věnována klonálnímu vývoji (KV) u CLL, studovaná v souboru 292 nemocných s opakovanými vyšetřeními pomocí FISH. Byly hledány rizikové faktory pro získání jednotlivých aberací a jejich vliv na přežití. Pro deleci 13q a 11q byl nalezen jediný faktor, a to doba mezi prvním vyšetřením a vyšetřením zachycujícím KV. Prognosticky nejhorší možný KV – získání delece *TP53* výrazně zkrátil celkové přežití, byl spojen s nemutovaným stavem *IgVH* genů, pozitivitou exprese CD38 a ZAP-70, a s předchozím podáním chemoterapie.

Disertační práce zahrnuje jak komentáře k vlastním publikačním výstupům bezprostředně související s tématem, tak výsledky rozšířených souborů dosud nepublikovaných.

Klíčová slova: cytogenetické aberace, FISH, CLL, KV, NHL.

Abstract

Malignant lymphoproliferative disorders include highly heterogeneous entities, i.e. lymphomas (Non-Hodgkin – NHL, as well Hodgkin´s lymphoma), lymphoid leukemias, multiple myeloma and others. As currently many chromosomal aberrations with diagnostic and prognostic significance are known, molecular cytogenetic analyses of tumor cell genome has become a substantial examination also in lymphoproliferative disorders. This thesis focuses primarily on chronic lymphocytic leukemia (CLL), which is one of the mature B-cell neoplasms and represents the most common type of leukemia. We analyzed four most frequently found aberrations (13q14 deletion, *ATM* and *TP53* gene deletion, and trisomy 12) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and also *IgH* gene aberrations in some patients. We compared the findings with other factors and clinical characteristics.

This work shows that the conventional G-banding is analysis relatively little relevant. FISH was more effective in detecting aberrations in CLL. Although none of the four aforementioned changes is specific to CLL, the prognostic impact is significant, particularly that of *TP53* deletion. Next, detection of some *IgH* gene translocations is essential in differential diagnosis of CLL and other NHL (follicular, mantle cell, diffuse large B cell, Burkitt´s lymphomas).

We attempted to confirm the impact of individual CLL aberrations. Our results verified the prognostic relevance of hierarchical categories. According to overall survival data, the best outcome was found in normal finding and 13q deletion subgroups, whereas it was intermediate in trisomy 12 and an inferior in *ATM* and *TP53* gene deletion categories.

The major part of the thesis deals with clonal evolution (CE) in CLL, studied in a cohort of 292 of patients subsequently analyzed by FISH. We investigated which risk factors relate to each type of CE and their influence on survival. In case of CE 13q and CE 11q, the only factor was found, namely the duration of follow-up. Prognostically the worst possible CE, the occurrence of *TP53* deletion, significantly shortened overall survival and was associated with unmutated *IgVH* gene status, positive of CD38 and ZAP-70 expression, and previous chemotherapy.

The Ph.D. thesis comprises comments on own published papers directly related to objectives as well as research results yet unpublished.

Key words: cytogenetic aberrations, FISH, CLL, CE, NHL.

OBSAH

1. <u>Úvod - NHL</u>	9
2. <u>CLL/SLL</u>	17
2.1. Fyziologie diferenciacie a maturace v B řadě	18
2.2. Etiologie	22
2.3. Patogeneze	23
2.4. Heterogenita průběhu onemocnění a prognostické faktory	25
2.4.1. Cytogenetika.....	28
2.4.1.1. <i>Delece 13q14</i>	29
2.4.1.2. <i>Trisomie 12</i>	30
2.4.1.3. <i>Delece 11q</i>	31
2.4.1.4. <i>Delece 17p13</i>	31
2.4.1.5. <i>Ostatní chromosomové změny</i>	32
2.5. Terapie	33
3. <u>Cíle práce</u>	34
4. <u>Materiál a metody</u>	35
4.1. Soubor pacientů	35
4.2. Klasická cytogenetická analýza	35
4.3. FISH	35
4.4. Analýza délky telomér	41
4.5. Detekce telomerázové aktivity	41
4.6. Imunofenotypizace	42
4.7. Stanovení mutace <i>IgVH</i> genů	42
4.8. Statistické analýzy	42

5. <u>Výsledky</u>	43
5.1. Molekulárně biologická a molekulárně cytogenetická analýza nemocných s CLL	
5.1.1 Komentář práce Berková A., <i>et al.</i> 2008.....	43
5.1.2. Porovnání nálezů klasické cytogenetiky a FISH.....	44
5.2. Klonální vývoj u CLL/SLL	51
5.2.1. Komentář k práci Berková A., <i>et al.</i> 2009	51
5.2.2. Doplnění souboru klonálního vývoje u CLL.....	53
5.2.2.1. Analýza celkového přežití	56
5.2.2.2. Predispozice ke klonálnímu vývoji	57
5.2.2.3. Závislost KV na sledovaných parametrech	58
5.2.2.4. Vliv na celkové přežití.....	60
5.2.2.5. Multivariantní analýza.....	62
5.3. Význam délky telomér u CLL	68
5.4. Význam cytogenetických analýz u NHL	71
5.4.1. Komentář k práci Šárová I. <i>et al.</i> , 2014.....	71
5.4.2. Double hit lymfomy	73
5.4.3. MCL	75
6. <u>Souhrn</u>	76
7. <u>Seznam použité literatury</u>	77
8. <u>Seznam příloh</u>	90
9. <u>Publikace</u>	91

1. Úvod - NHL

Jako nádorové lymfoproliferace označujeme v širším smyslu slova nádory vycházející z lymfocytů, a dělíme je na nádory z B, T buněk, prekurzorové a periferní. Z historických důvodů se používá dělení na lymfomy Hodgkinovy, non-Hodkinovy, mnohočetný myelom, akutní lymfoblastickou a chronickou lymfocytární leukémií a další.

Víme však, že se na jednu stranu jedná o tumory vysoce heterogenní, na druhou stranu jsou například chronická lymfatická leukémie a lymfom z malých lymfocytů, či akutní lymfoblastová leukémie a lymfoblastový lymfom považovány za jednu jednotku (Swerdlow S.H. *et al.*, 2008).

Historicky jsou non-Hodgkinské lymfomy (NHL) všechny typy lymfomů s výjimkou Hodgkinova lymfomu (HL).

K této logické definici je třeba doplnit:

- Již v roce 1832 anglický lékař a patolog Thomas Hodgkin (1798-1866) popsal ve své práci nazvané „On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen” zvětšení lymfatických uzlin a sleziny jako „lymphogranulomatosis maligna“ (Hodgkin T., 1832), které později lékař Samuel Wilks ve své práci z roku 1856 poprvé nazval Hodgkinovou nemocí (Wilks S., 1856). Původní Hodgkinovy preparáty jsou uchovány v londýnské nemocnici Guy’s Hospital dodnes a zajímavé je, že při histologické revizi roku 1926 (60 let po Hodgkinově smrti) se jeho diagnóza potvrdila jen u tří ze sedmi vzorků – u ostatních šlo o non-Hodgkinský lymfom, syfilis a tuberkulózu (Fox X., 1926). V léčbě Hodgkinovy choroby mělo použití radioterapie už na začátku 20. století výborné výsledky (na rozdíl od jiných typů lymfomů), proto se badatelé intenzivně zaměřili právě na tuto nemoc a výsledkem bylo navržení první klasifikace již v roce 1963 (Lukes R.J., 1963). Zatímco u Hodgkinova lymfomu bylo brzy poté dosaženo konsenzu v diagnostice i léčbě, zůstávala stále velká skupina jiných lymfoproliferací zasluhujících neméně pozornosti (Bonadonna G., 2000).
- Ve všeobecně přijímané klasifikaci WHO 2008 už pojem non-Hodgkinský lymfom (NHL) nenajdeme, nicméně je stále používán jak lékaři (před možnou

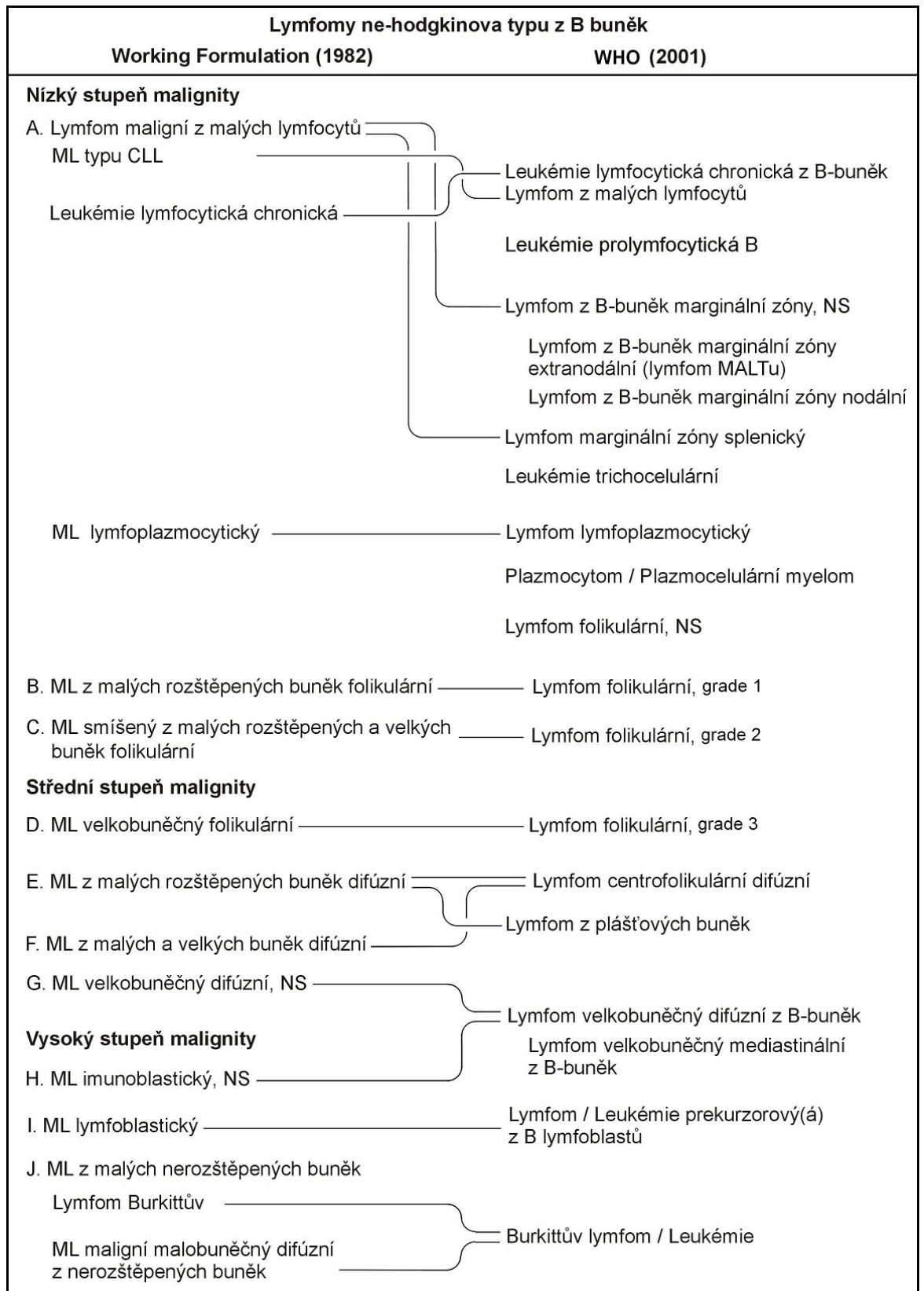
specifikací typu), tak i onkologickými registry – například český Národním onkologický registr (NOR), americký National Cancer Institute (NCI), mezinárodní projekt WHO International Agency for Research of Cancer (IARC) i evropský European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC).

Jiné lymfomy (než Hodgkinův) tedy zahrnují rozmanitou skupinu nádorových onemocnění, vycházející z lymfocytů. Pojem Non-Hodgkinské lymfomy (NHL) byl poprvé použit v klasifikaci známé jako Working Formulation v roce 1982, kde byly NHL rozděleny pouze podle morfologických kritérií (tedy bez rozlišení B- a T- původu) do tří skupin podle klinického průběhu - na low (nízce), intermediate (středně) a high grade, neboli vysoce agresivní lymfomy (Autor neuveden, Cancer 1982).

Současná klasifikace lymfoidních malignit vychází z posledního vydání WHO klasifikace 2008 (Swerdlow S.H. *et al.*, 2008) a základem je dělení na tři hlavní kategorie: B-lymfoidní malignity, T/NK malignity (díky společným funkčním a imunofenotypovým znakům jsou zařazeny do jedné skupiny), a Hodgkinův lymfom (přestože i ten vychází z B buněk, konkrétně z buněk germinálního centra) (Kuppers R, Rajewsky K., 1998). Jednotlivé typy pak zahrnují jak lymfom, tak lymfoidní leukémii, neboť u mnoha lymfoproliferací jsou přítomny obě formy – solidní i cirkulující. U kategorií B a T/NK dále rozlišujeme dvě hlavní skupiny: 1) prekurzorové leukémie/lymfomy, vzniklé proliferací buněk v časných stádiích diferenciaci, a 2) malignity ze zralých buněk (též periferní), odpovídající diferencovanějším buňkám. **Obrázky 1 a 2** znázorňují vývoj klasifikace NHL od Working Formulation 1982 k nynějšímu rozdělení podle WHO. Spojnicemi jsou vyznačeny ekvivalentní malignity.

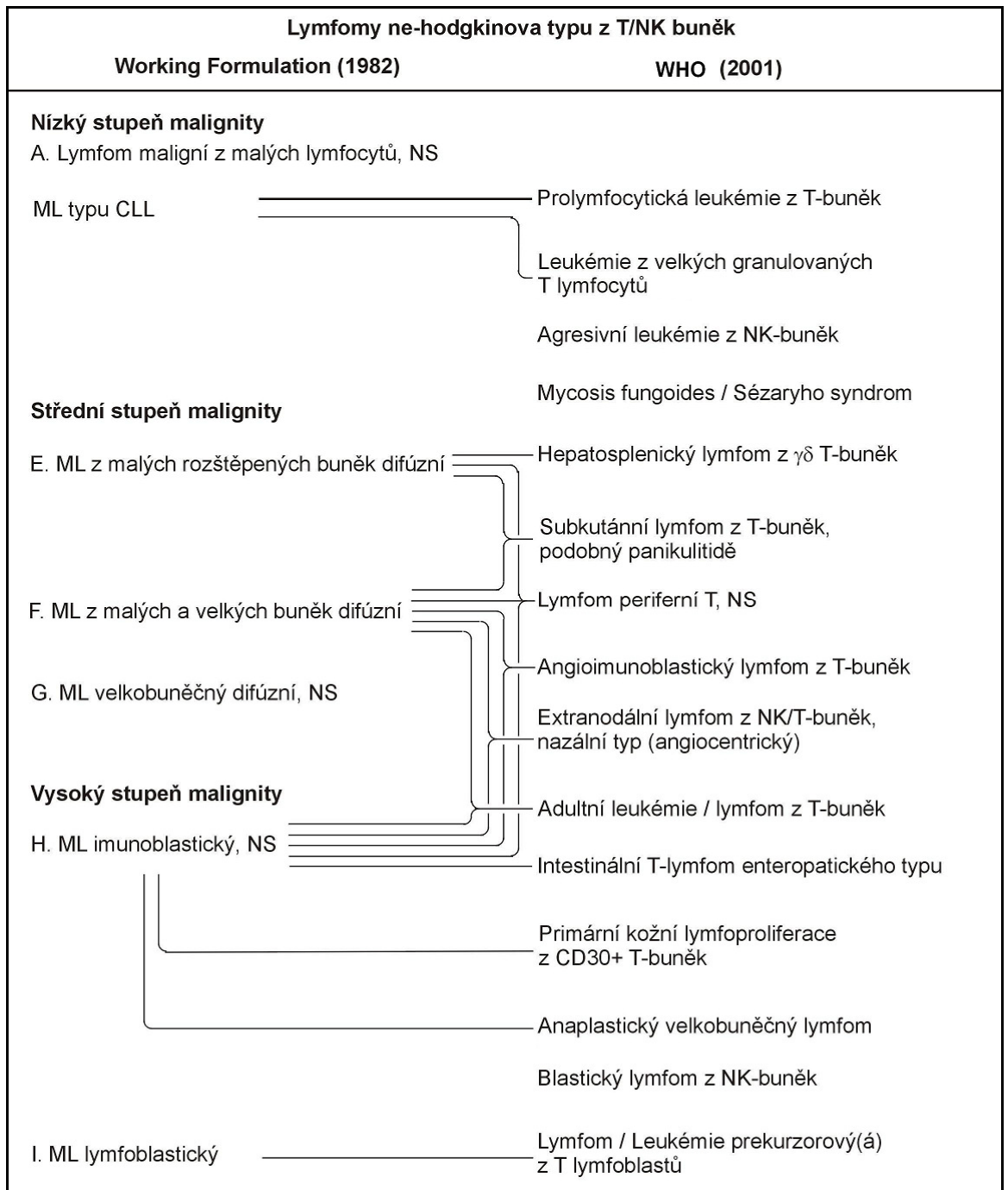
Současná klasifikace podle WHO 2008 je uvedena v **Tabulce 1**.

Obrázek 1. Vývoj klasifikace B-NHL (Stříteský J., nepublikováno).



ML – maligní lymfom, NS – blíže nespecifikovaný

Obrázek 2. Vývoj klasifikace T-NHL (Stříteský J., nepublikováno).



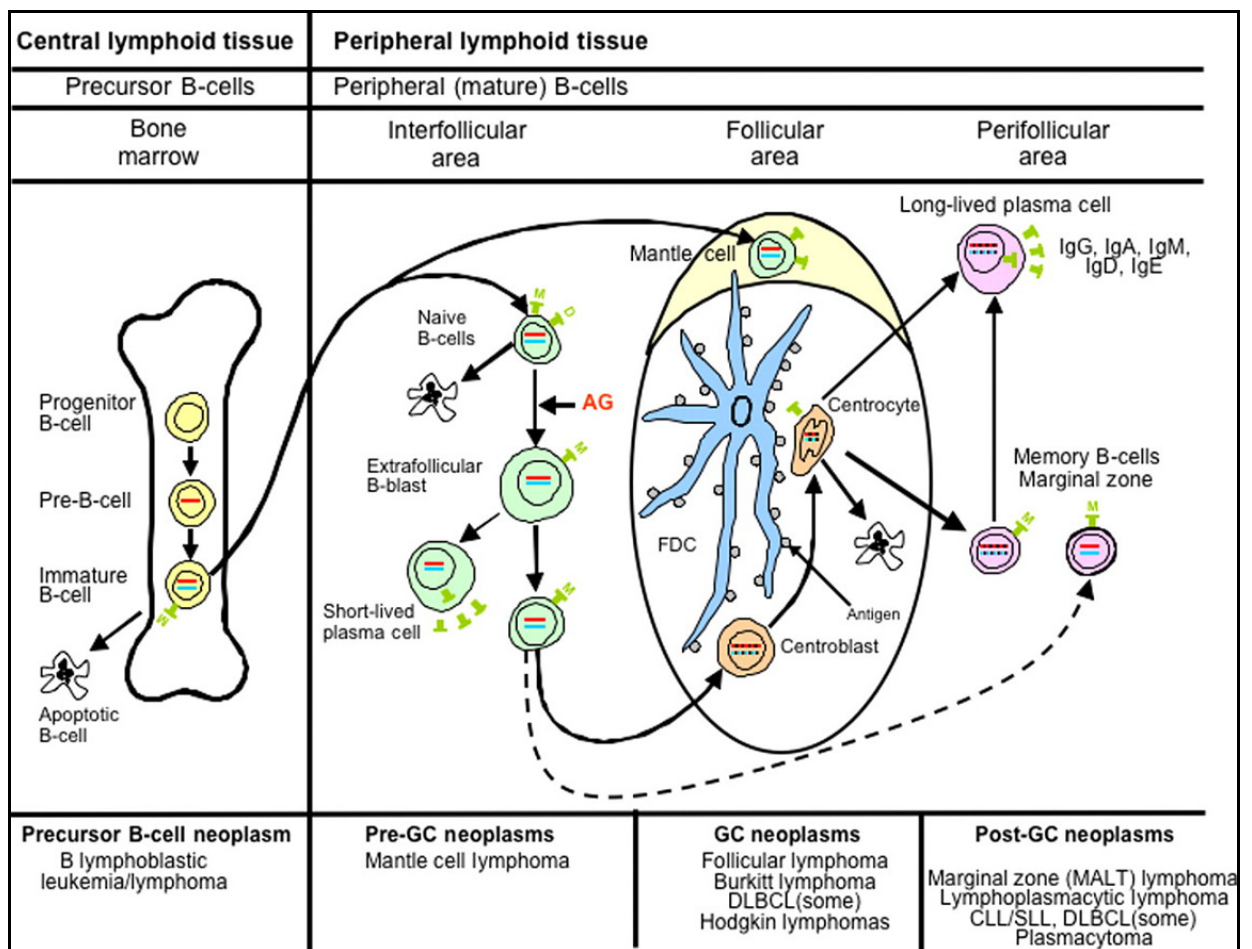
ML – maligní lymfom, NS – blíže nespecifikovaný

Tabulka 1. Zjednodušená WHO klasifikace lymfoidních malignit (2008).

B-lymfoidní malignity	T a NK malignity	Hodgkinův lymfom
Prekurzorové	Prekurzorové	
B-akutní lymfoblastická leukémie/lymfom	T-akutní lymfoblastická leukémie/lymfom	
Periferní	Periferní	Nodulární lymfocytárně predominantní
<p>Chronická lymfocytární leukémie/lymfom z malých lymfocytů (CLL/SLL)</p> <p>Splenický B-lymfom z marginálních buněk</p> <p>Vlasatobuněčná leukémie (HCL)</p> <p>Lymfoplasmocytový lymfom (LPL)</p> <p>Mnohočetný myelom (MM)</p> <p>Extranodální lymfom z buněk marginální zóny typu MALT</p> <p>Nodální lymfom z buněk marginální zóny</p> <p>Folikulární lymfom (FL)</p> <p>Lymfom z buněk pláště (MCL)</p> <p>Difusní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL)</p> <p>Primární mediastinální velkobuněčný lymfom (PMBL)</p> <p>Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom</p> <p>Burkittův lymfom (BL)</p> <p>Neklasifikovatelný B-lymfom, se znaky mezi DLBCL a Burkittovým lymfomem</p> <p>Neklasifikovatelný B-lymfom, se znaky mezi DLBCL a Hodgkinovým lymfomem</p>	<p>T-prolymfocytární leukémie (T-PLL)</p> <p>T-leukémie z velkých granulovaných lymfocytů (T-LGL)</p> <p>Agresivní leukémie z NK buněk</p> <p>T-buněčná leukémie dospělých</p> <p>Lymfom podobný hydroa vacciniiforme</p> <p>Extranodální T/NK lymfom, nosní typ</p> <p>T-lymfom sdružený s enteropatií</p> <p>Hepatosplenický T lymfom</p> <p>Podkožní T lymfom podobný panikulitidě</p> <p>Mycosis fungoides</p> <p>Sezaryho syndrom</p> <p>Primární kožní CD30 pozitivní T-lymfoproliferace</p> <p>Primární kožní gamma-delta T-lymfom</p> <p>Periferní T-lymfom, blíže nespecifikovaný</p> <p>Angioimunoblastový T-lymfom</p> <p>Anaplastický velkobuněčný T-lymfom, ALK pozitivní (ALCL, ALK+)</p> <p>Anaplastický velkobuněčný T-lymfom, ALK negativní (ALCL, ALK-)</p>	<p>Klasický Hodgkinův lymfom</p> <p>Klasický Hodgkinův lymfom, nodulární skleróza</p> <p>Klasický Hodgkinův lymfom bohatý na lymfocyty</p> <p>Klasický Hodgkinův lymfom, smíšená celularita</p> <p>Klasický Hodgkinův lymfom, lymfocytární deplece</p>

Přes 90 % NHL patří mezi periferní B-lymfoidní malignity (Autor neuveden, Blood 1997; Autor neuveden, Journal of Clinical Oncology 1998). Tyto lymfomy v mnoha ohledech napodobují stádia diferenciace normálních B lymfocytů a právě tato podobnost je základem jejich klasifikace a nomenklatury, jak znázorněno na **obrázku 3**.

Obrázek 3. Schematické znázornění stádií diferenciace B buněk a od nich odvozené B-lymfoidní malignity. Prekursor B buněk vyžívající v kostní dřeni (bone marrow) mohou zaniknout apoptózou nebo pokračovat ve vývoji do stádia zralé naivní buňky. Ta se po setkání s antigenem (AG) a blastické transformaci vyvine buď v krátkodobě žijící plasmocyt nebo vstoupí do germinálního centra (GC) lymfatického folikulu, kde proběhne somatická hypermutace a izotypový přesmyk *IgH* třídy, čímž vznikne centroblast, který buď zanikne, nebo se vyvine v centrocyt. Postgerminální buňky (post-GC) zahrnují jak dlouhožijící plasmocyty, tak paměťové B buňky. Většina B buněk je aktivována v GC, ale může také dojít k aktivaci nezávislé na T buňkách mimo GC, z nichž se také stávají paměťové buňky (převzato z práce Jaffe E.S. *et al.*, 2008).

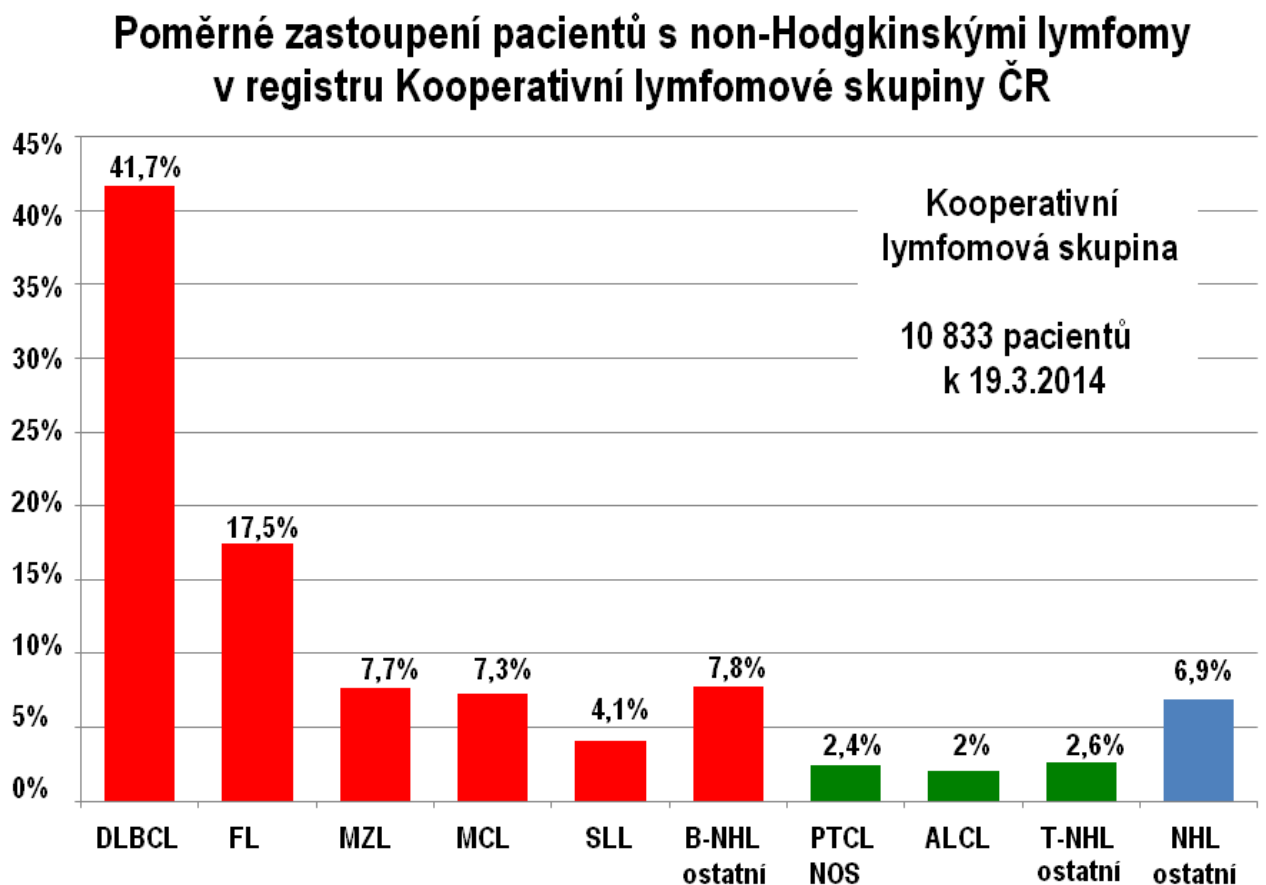


AG – antigen, FDC – folikulární dendritická buňka

Z epidemiologického hlediska patří B a T/NK malignity mezi nádorová onemocnění se stoupající incidencí. Jsou častější v západních, vyspělých zemích (z největších USA, Austrálie a Evropa) s roční incidencí přes 15/100 000 obyvatel v USA, v porovnání s 1,2/100 000 obyvatel v Číně, přičemž někde mezi tím je incidence v Jižní Americe, Africe a Japonsku (Parkin D.M. *et al.*, 1999).

Až 50 % NHL tvoří dva nejčastější typy, a to difusní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) a folikulární B-lymfom (FL), například v České republice jsou to až dvě třetiny pacientů (Trněný M. *et al.*, 2007; Pytlík R. *et al.*, 2013). Poměrné zastoupení NHL v České republice podle registru Kooperativní lymfomové skupiny (KLS) je na **obrázku 4**.

Obrázek 4. Poměrné zastoupení NHL v České republice (www.lymphoma.cz).



DLBCL – difusní velkobuněčný B-lymfom, FL – folikulární lymfom, MZL – lymfomy z buněk marginální zóny (všechny podtypy souhrnně), MCL – lymfom z buněk pláště, SLL – lymfom z malých lymfocytů, PTCL-NOS – periferní T-lymfom blíže neurčený, ALCL – anaplastický velkobuněčný T-lymfom

Většina registrů však nepracuje s přesným rozdělením hematologických onemocnění na podtypy podle WHO klasifikace (NOR, IARC i EORTC). Z tohoto hlediska je nejdokonalejší americký projekt NCI SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program), který poskytuje údaje o incidenci a mortalitě jednotlivých typů NHL zvláště. Podle tohoto aktuálního zdroje, víceméně korespondujícím s Českou populací, je obecná incidence DLBCL 6,9, CLL/SLL 5,8 a FL 3,7/100 000 obyvatel, a věkově specifická incidence nad 65 let (včetně) pak u DLBCL 32,7, CLL/SLL 32,4 a FL 15,3/100 000 obyvatel (Howlader N. *et al.*, 2014).

Zdaleka nejčastější formou diseminované / leukemické neoplázie B řady (a zároveň ne Hodgkinského lymfomu) je CLL/SLL (Trnec M. *et al.*, 2011). Vzhledem k mému postgraduálnímu studiu v Centru nádorové cytogenetiky ÚLBD VFN a 1. LFUK, kde se zabýváme zejména cytogenetickými a molekulárně cytogenetickými analýzami leukémií a preleukémií, se v mé disertační práci budu věnovat zejména diagnóze CLL/SLL.

2. CLL/SLL

Chronická lymfatická leukémie (CLL) / lymfom z malých lymfocytů (SLL) je nádorové onemocnění, pro které je charakteristická akumulace klonu morfoloogicky zralých lymfocytů v kostní dřeni, periferní krvi a lymfatických tkáních. Jde o 2 klinické formy téhož onemocnění (Harris N.L. *et al.*, 1999; Jaffe E.S. *et al.*, 2001; Swerdlow S.H. *et al.*, 2008). Naprostá většina případů CLL (> 99 %) je lymfoproliferací buněk B řady a podle Foonovy i Catovského skupiny by měl být termín CLL používán pouze pro B-CLL (Foon K.A., Gale R.P. 1992; Matutes E., Catovsky D. 1993).

CLL je nejčastějším typem leukémie v západním světě - podílí se 38 % na incidenci všech leukémií (Howlader N. *et al.*, 2014). Poměr postižení u mužů a žen je zhruba 2:1, nejčastěji se vyskytuje u osob mezi 60-80 lety (Wiernick P.H., 1996), medián věku v době diagnózy je kolem 65 let (Rozman C., Montserrat E., 1995), v ČR 70 let (Trněný M. *et al.*, 2007). Incidence roste s věkem, u osob pod 30 let je CLL extrémně vzácná. Pouze 6-15 % pacientů bývá mladších než 50 let (Wiernick P.H., 1996). Tím, že se stále častěji indikuje vyšetření krevního obrazu, je stále vyšší záchyt asymptomatických mladších pacientů (Wiernick P.H., 1996; Rozman C., Montserrat E., 1995; Montserrat E., 2004). Rodinný výskyt je u CLL ze všech leukémií nejběžnější, popisuje se až ve 2 % případů. V naprosté většině případů familiárního výskytu jde o klonální expanzi buněk s mutovanými *IgV* geny těžkých řetězců (Pritsch O. *et al.*, 1999). U rodinných příslušníků pacientů postižených CLL bývá ještě častěji popisováno prekurzorové stádium CLL, tak zvaná monoklonální B-lymfocytóza (MBL), jinak též nazývaná klonální lymfocytóza nejasného významu (CLUS). MBL je definována přítomností klonální populace B lymfocytů při nesplnění diagnostických kritérií CLL a nepřítomnosti jiných známek lymfoproliferativního onemocnění. V populaci vyšetřených osob nad 40 let věku se vyskytuje asi u 3,5 % (Swerdlow S.H. *et al.*, 2008). Pouze u 10 % osob s MBL dojde k vývoji klinicky manifestního onemocnění (Rawstron A.C. 2013). Lymfocytární klony u MBL mají znaky obvykle podobné CLL s dobrou prognózou, jsou CD38 negativní a mají vysoké procento promutování *IgVH* genů (4,8-6,6 %) (Rawstron A.C. *et al.*, 2002).

2.1. Fyziologie diferenciaci a maturace v B řadě

Normální diferenciaci B buněk probíhá ve dvou základních etapách: nejdříve v kostní dřeni, později v lymfatickém orgánu. Během tohoto vývoje *Ig* geny budoucího B lymfocytu podstoupí celkem 3 významné změny:

1. přestavbu genových segmentů *V*, *D* a *J*,
2. proces somatické hypermutace,
3. rekombinaci DNA spojenou s izotypovým přesmykem třídy *Ig*.

V kostní dřeni proběhne iniciální diferenciaci do B řady. Prekursorová pro-B buňka prodělá pod vlivem četných enzymů (včetně TdT, exonukleáz a enzymů rekombinázového komplexu RAG-1 a RAG-2) přeskupení (rearrangement) *V*, *D* a *J* (variabilních, diverzitních a spojovacích) genových segmentů kódujících těžké (*H*) řetězce *Ig* genu procesem tak zvané somatické rekombinace (Dyer M.J, Oscier D.G., 2002; Hořejší V., Bartůňková J., 2002; Lefranc M.P., Lefranc G., 2001; Lewin B., 2000; Roitt I.M., Delves P.J., 2001). Za jeho objev byla v roce 1987 udělena S. Tonegawovi Nobelova cena (Dyer M.J., Oscier D.G., 2002). V *IgH* lokusu (celková délka 1250 kb), ležícím telomericky na chromosomu 14 (pruh 14q32.33), je k tvorbě *H* řetězce *Ig* k dispozici až 129 *VH* genů (přesněji subgenů či genových segmentů), z toho až 88 funkčních, patřících do 7 základních rodin. Směrem k centromere je 27 různých *D*, 9 *JH* a konečně 11 *CH* (sub)genů (Lefranc M.P., Lefranc G., 2001). Zařazení *VH* genu do určité rodiny, respektive podrodiny, se řídí podle podobnosti jejich sekvencí. Na genetické mapě lokusu jsou *VH* geny určité rodiny a podrodiny různě roztroušeny mezi geny jiných rodin a podrodin bez ohledu na to, zda jsou funkční či nikoli. Z této nabídky *IgH* genů je v procesu přestavby náhodně vybráno po jednom z *VH*, *D* a *JH* genů, ostatní jsou vyštěpeny. Nejdříve dochází k přeskupení *D-J*, potom *V-D* segmentů. Tyto genové segmenty se během tohoto procesu spojí krátkými N-sekvencemi (obvykle 5-20 nukleotidů), které nejsou součástí původní zárodečné konfigurace *IgH* genů a náhodně se vmezeří mezi spojované genové segmenty. Jakmile je toto přeskupení na jednom chromosomu ukončeno a dojde k přepisu (spojenému s obvyklým splicingem) a následně ke vzniku kompletního H polypeptidu, je proces přeskupování, probíhající zároveň i na druhém z páru chromosomů, ukončen. Tento jev se nazývá alelická exkluze. Normální B buňka proto exprimuje vždy jen jeden přestavěný *IgH* gen. Po zdárné přestavbě *IgH* genů se z buňky stává pre-B lymfocyt (Stevenson F.K.,

Caligaris-Cappio F. 2004; Dyer M.J., Oscier D.G., 2002; Hořejší V., Bartůňková J., 2002; Lefranc M.P., Lefranc G., 2001; Lewin B., 2000; Roitt I.M., Delves P.J., 2001). Teprve potom nastává obdobná přestavba genů lehkých (*L*) řetězců κ a λ v chromosomových oblastech 2p11.2, respektive 22q11.2. Pre-B buňka do té doby používá k tvorbě provizorního B receptoru náhradní *L* řetězec (ψL) složený ze dvou malých proteinů, produktů genů *VpreB* a *$\lambda 5$* . Přestavba *IgL* genů (tj. *Ig κ* nebo *Ig λ*), kódujících *L* řetězce, je jednodušší o to, že na rozdíl od *IgH* genů neobsahují segmenty *D* a segmentů *VL* a *JL* je na výběr méně. Není-li úspěšná přestavba genů kódujících řetězec κ ani na jednom z chromosomů, buňka zkusí přestavět genové segmenty λ . Nezdáří-li se ani tato přestavba, buňka zanikne. Po úspěšné přestavbě genů pro *H* i *L* řetězce se vytvoří plnohodnotný *Ig* (třídy IgM), zakotvený v povrchové membráně. Asociací *Ig* s dalšími transmembránovými molekulami *Ig α* (CD79a) a *Ig β* (CD79b) vzniká komplex B-buněčného receptoru (BCR) (Stevenson F.K., Caligaris-Cappio F., 2004; Hořejší V., Bartůňková J., 2002; Lefranc M.P., Lefranc G., 2001). Při styku s antigenem CD79a a CD79b nejprve aktivují tyrozin-kinázy syk a lyn, které následně fosforylují imunoreceptorové, na tyrozinu založené aktivační motivy (ITAMs) cytoplasmatických domén imunoglobulinového receptoru. Fosforylace ITAMs spouští aktivační kaskádu včetně aktivace Brutonovy tyrozin-kinázy (BTK), a ta přes fosfolipázu C gama 2 (PLC γ 2) vede k proliferaci, k úniku apoptóze a k aktivaci integrinu upregulací specifických transkripčních faktorů, například NK- κ B (Mohamed A.J. *et al.*, 2009). Právě BTK je zásadním mediátorem BCR signalizace, která je u CLL buněk deregulovaná. V současné době je vkládána velká naděje do použití specifických inhibitorů BTK (např. ibrutinib) v léčbě CLL a dalších B lymfoproliferací (Burger J.A., 2014).

Buňka vybavená kompletním BCR představuje nezralý B lymfocyt. V tomto stádiu dochází k eliminaci buněk, jejichž IgM má autoreaktivní specifitu. Setkání s antigenem v tomto stádiu znamená silný negativní signál, který vede k apoptotické smrti buňky (Hořejší V., Bartůňková J., 2002). Alternativním sestřihem *C* (konstantních) subgenů přestavěného *IgH* genu pak dojde k expresi nejen IgM, ale i IgD (přičemž jsou přepisovány geny *C μ* i *C δ*), a buňka se stává zralým naivním B lymfocylem. Tyto naivní, dosud neaktivované B lymfocyty, pak čekají na antigen (resp. antigen projeví k určitému z nabízených *Ig* nejvyšší afinitu). Obrovské množství možných kombinací různých *V*, *D*, i *J* genových segmentů zajišťuje po jejich přestavbě i obrovskou šíři nabídky různých *Ig* genů v různých B lymfocytech – celkem přes 3 milióny funkčních přestaveb. Diverzita je ještě umocněna různorodostí N sekvencí, které pak zakládají jakýsi individuální otisk

(fingerprint) každého *Ig* genu. Odhaduje se, že je celkem připraveno vázat antigen asi $1,5 \times 10^9$ různých BCR. Popsanými mechanismy je vytvořen základní protilátkový repertoár lymfocytů, stále nezávisle na antigenu (Dyer M.J., Oscier D.G., 2002; Roitt I.M., Delves P.J., 2001; Tomlinson I.M. *et al.*, 1995; Naylor M., Capra J.D., 1999; Kolar G.R., Capra J.D., 2004).

Z hlediska setkání s antigenem ještě naivní, CD38 pozitivní buňky exprimující povrchový IgM a IgD cestují krví (představují 60 % cirkulujících B-buněk, až 25 % z nich může být CD5 pozitivních) a usazují se v lymfatických uzlinách, nejdříve v plášťové oblasti lymfatického folikulu. Teprve v germinálním centru folikulu jsou vystaveny styku s antigenem, obvykle za pomoci T buněk. Někdy však může dojít k setkání s antigenem mimo germinální centrum folikulu v marginální zóně uzliny, a to bez nutnosti pomoci T buněk (Chiorazzi N. *et al.*, 2005; Dyer M.J., Oscier D.G., 2002). Po styku s antigenem dochází k somatické mutaci (hypermutaci) V segmentů *Ig* genu, a to jak těžkých, tak lehkých řetězců (*IgVH* a *IgVL*) (Dyer M.J., Oscier D.G., 2002). V podstatě jde o bodové mutace, ke kterým preferenčně dochází v CDR (complementarity determining regions) oblastech *IgV* genů. CDR oblasti jak H, tak L polypeptidu tvoří po 3 smyčkách. Smyčky H a L řetězců tvoří vzájemnou apozici jakousi kapsu, do které je pohlcen antigen. Oblasti CDR1, CDR2 a CDR3 jsou kódovány V subgeny (*H* i *L* řetězců), pouze CDR3 oblast *H* řetězce je kódována genovým segmentem *D* a na něj z obou stran napojenými N sekvencemi. Tyto oblasti jsou místem vlastního styku membránového *Ig* s antigenem. Tato interakce s antigenem vede k mutacím V genů pro H i L řetězce, a to právě v jejich CDR oblastech (Roitt I.M., Delves P.J., 2001). Mutace ještě zvýší afinitu daného BCR ke svému antigenu. Somatickými mutacemi ještě narůstá již tak velká různorodost repertoáru *Ig* genů a jejich produktů. Po setkání s antigenem B buňka rovněž přestane exprimovat antigen CD38.

Posledním rekombinačním procesem, který nastane krátce po hypermutaci, je rekombinace DNA spojená s izotypovým přesmykem třídy *Ig* (class switch) (Dyer M.J., Oscier D.G., 2002; Hořejší V., Bartůňková J., 2002; Roitt I.M., Delves P.J., 2001). Při něm dochází k eliminaci rozsáhlých částí *C* genů - buňka ireverzibilně ztratí genové segmenty *C μ* a *C δ* a zůstane jí některý ze segmentů *C γ* , *C α* , eventuálně *C ϵ* (Hořejší V., Bartůňková J., 2002; Roitt I.M., Delves P.J., 2001) takže nakonec exprimuje buď IgG, IgA, nebo IgE. Dvě poslední změny v DNA (tedy somatická hypermutace a izotypový přesmyk) mají

společné to, že jsou pod kontrolou stejného enzymu – AICD (aktivací indukované cytidin deaminázy) (Dyer M.J., Oscier D.G., 2002).

Po setkání s antigenem začne aktivovaná B buňka signalizovat a proliferovat (blastická transformace). V germinálním centru se tak tvoří morfologicky nezralé centroblasty. Jejich zráním vznikají centrocyty (Naylor M., Capra J.D., 1999; Damle R.N. *et al.*, 2000) a jejich další diferenciací pak vznikají buď lymfoplasmocytoidní buňky a plasmocyty produkující volný *Ig*, anebo CD38 negativní paměťové B buňky. Paměťové buňky opustí germinální centra a osidlují extrafolikulární oblasti lymfatických orgánů – marginální zónu lymfatických uzlin (především subkapsulární oblasti), sleziny, subepiteliální oblasti tonsil a Peyerovy plaky, kde zajišťují obranu proti patogenům bez potřeby asistence T buněk.

2.2. Etiologie

Etiologie je považována multifaktoriální, nicméně je velmi pravděpodobné, že důležitou roli při vzniku onemocnění hraje získaný genetický defekt. U většiny pacientů (až v 82 %) sice lze moderními metodami prokázat cytogenetickou aberaci (Döhner H. *et al.*, 2000), ale nebylo nikdy potvrzeno, že by právě tyto aberace byly primární noxou při rozvoji CLL. Na druhou stranu již u MBL byla ve vysokém procentu prokázána delece 13q14 (Rawstron A. *et al.*, 2004), což je zároveň nejčastější cytogenetická změna u CLL. Studuje se celá řada změn také na úrovni mutací, miRNA a dalších (Zhang S., Kipps T.J., 2014). Některé práce však svědčí spíše pro možnost geneticky fixované náchylnosti k onemocnění. Mezi ně patří již zmíněná vysoká míra incidence CLL i MBL u nejbližších příbuzných pacientů s CLL (Caporaso N. *et al.*, 2004). V experimentální oblasti byly předloženy zajímavé doklady o možném defektu na úrovni kmenové buňky (Kikushige Y. *et al.*, 2011). Není známo, co je příčinou velmi různorodé incidence onemocnění v různých oblastech světa u různých etnik. Na rozdíl od situace u akutních leukémií a chronické myeloidní leukémie, ionizační záření patrně nezvyšuje výskyt CLL. Ani mezi ozářeními atomovou bombou v Hirošimě a Nagasaki nebyl zaznamenán zvýšený výskyt CLL. Nejsou známy žádné lékové vlivy na výskyt CLL a zatím nebyla prokázána ani virová etiologie (Wiernick P.H., 1996). U imunodeficitů, ať již vrozených nebo navozených léčbou (např. potransplantačních), bývá vyšší riziko různých malignit včetně lymfomů, nikoli však CLL. Značný význam se přisuzuje antigenní stimulaci B buněk, ať již exogenními virovými nebo bakteriálními antigeny, tak i autoantigeny či superantigeny, viz dále (Chiorazzi N. *et al.*, 2005; Ferrarini M., Chiorazzi N., 2004; 22 Caligaris-Cappio F., Ghia P., 2004; Stevenson F.K., Caligaris-Cappio F. 2004).

2.3. Patogeneze

Ze tří základních patogenetických mechanismů u maligních onemocnění (to je poruchy diferenciacie a maturace, poruchy kontroly proliferace a poruchy apoptotických dějů), se u CLL uplatňuje především poslední mechanismus. Dochází postupně ke kumulaci monoklonálních B lymfocytů, které neproliferují a setrvávají v G0 fázi buněčného cyklu. Molekulární defekty umožňující těmto buňkám přežít, jsou aberace v apoptotických drahách a relativní převaha antiapoptotických molekul (Mráz *et al.*, 2010). U většiny nemocných s CLL byla zjištěna zvýšená exprese antiapoptotického proteinu bcl-2 (Hanada M. *et al.*, 1993). Podle některých studií je pro průběh CLL klíčový především poměr proteinů bcl-2 (antiapoptotický protein) a bax (proapoptotický protein) (Munk Pedersen I., Reed J., 2004), zatímco jiná studie význam poměru bcl-2/bax nepotvrdila (Kitada S. *et al.*, 1998). Navíc Kitada a kolektiv provedli rozsáhlou analýzu exprese proteinů rodiny Bcl-2 (bcl-2, mcl-1, bax, bak, baf) ve vztahu k odpovědi CLL buněk na terapii chlorambucilem a fludarabinem, a prokázali nejsilnější asociaci rezistence s expresí antiapoptotického proteinu mcl-1. Z terapeutického hlediska, inhibitory exprese bcl-2 a mcl-1 také představují jednu ze slibných oblastí pro vývoj nových léčebných látek (Pleyer L. *et al.*, 2009).

Také diferenciacie CLL buněk je mírně atypická. Uchovávají si expresi některých znaků, které jsou obvyklé u normálních T buněk. Jde o expresi znaku CD5 a rovněž o expresi intracelulárního proteinu ZAP-70 - 70 kDa tyrozinové kinázy (Caligaris-Cappio F., Ghia P., 2004), která je spojena se ζ řetězcem CD3 molekuly a podílí se na tvorbě T-buněčného receptoru pro antigen (TCR) u T a NK buněk (Chiorazzi N. *et al.*, 2005; Ferrarini M., Chiorazzi N., 2004; Keating M.J. *et al.*, 2003). ZAP-70 nebývá exprimován v normálních B buňkách, ale byl zjištěn v CLL buňkách a v některých buněčných liniích B lymfomů. Výrazně více ZAP-70 proteinu exprimují CLL s nemutovanými *IgVH* geny. ZAP-70 u nich zesiluje signalizaci BCR při stimulaci povrchového IgM, která vede ke zvýšení fosforylace proteinu syk (Keating M.J. *et al.*, 2003; Chen L. *et al.*, 2005). Jistá příbuznost CLL buněk s T řadou opravňuje hypotézu, že primární noxa u CLL se může odehrávat již na úrovni lymfoidní progenitorové buňky společné pro B i T řadu (Caligaris-Cappio F., Ghia P., 2004). Tato buňka však neztratila schopnost diferenciacie a maturace alespoň do té míry, že je schopna vytvořit funkční BCR.

Složitou problematikou je úloha mikroprostředí lymfatické tkáně nebo kostní dřeně. Mikroprostředí velmi zásadně ovlivňuje jak proces apoptózy, tak i proliferace. Uplatňují zde svůj vliv stromální buňky kostní dřeně, folikulární dendritické buňky, a tak zvané ošetrovatelské buňky (nurse-like cells) zase chrání leukemický klon před spontánní apoptózou například prostřednictvím sekrece různých chemokinů (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, G-CSF, IFN- α , IFN- γ , TNF- α) (Caligaris-Cappio F., Ghia P., 2004). Tyto buňky exprimují CD154 (ligand pro CD40), což je aktivační antigen CLL buněk a vazbou tohoto ligandu je stimulována proliferace (Caligaris-Cappio F., Ghia P., 2004; Schattner E.J., 2000). Dalším mechanismem zvýšeného přežívání CLL buněk může být konstitutivní aktivace signální dráhy pro přežití buněk, například NF κ B (Munk Pedersen I., Reed J, 2004). Stěžejní význam mikroprostředí pro přežití CLL buněk je patrný při jejich kultivaci *in vitro*, kde bez kontaktu s podpůrnými buňkami spontánně umírají.

2.4. Heterogenita průběhu onemocnění a prognostické faktory

Dighiero (Dighiero G. *et al.*, 1991) popisují 3 typy CLL:

1. poměrně rychle progredující,
2. pomalu progredující,
3. doutnající typ onemocnění.

Do každého typu průběhu onemocnění spadá zhruba třetina nemocných. U většiny pacientů různě rychle narůstá absolutní množství lymfocytů v periferní krvi. Zvětšují se uzliny, slezina a méně často játra, zvyšuje se infiltrace kostní dřeně. U progresivnějších forem je utlačována normální hematopoeza, vyvíjí se anemie a trombocytopenie, zvyšují se hladiny LDH a β 2-mikroglobulinu v séru (Rozman C., Montserrat E., 1995). Postupem času progreduje i imunodeficit a vzrůstá frekvence komplikací, především infekčních, které jsou nejčastější příčinou úmrtí u pacientů s CLL (Oscier D. *et al.*, 2004). Jen menší počet pacientů zemře bezprostředně následkem transformace onemocnění v agresivnější typ lymfoproliferace (Richterův syndrom). Vzhledem k incidenci CLL ve vyšším věku a dlouhému mediánu přežití však téměř polovina pacientů zemře na onemocnění bezprostředně nesouvisející s CLL, častější jsou sekundární malignity, včetně akutní myeloidní leukemie (Rozman C., Montserrat E., 1995). U nezanedbatelné části pacientů s CLL nedojde nikdy k výraznějším symptomům, progresse onemocnění je takřka nulová anebo velice pomalá a nemocní nepotřebují nikdy žádnou antileukemickou léčbu. Medián přežití těchto pacientů může být delší než 25 let a onemocnění jim nezkrátí život. Tato forma CLL bývá někdy označována jako indolentní (doutnající) (Dighiero G. *et al.*, 1991; Han T. *et al.*, 1984; Molica S. *et al.*, 1995). Průběh lze dopředu většinou odhadnout podle prognostických faktorů – viz níže.

Pro hodnocení dosažené pokročilosti onemocnění - klinický staging, se již od roku 1975 ukazuje jako velmi užitečný systém podle Raie (Rai K.R. *et al.*, 1975). Ten rozděluje pacienty do 5 prognostických skupin (0-IV) podle přítomnosti zvětšených uzlin (bez ohledu na to, v kolika anatomických oblastech), zvětšených jater a sleziny, přítomnosti anemie a trombocytopenie. Podobný systém o 5 stádiích byl ve Francii navržen Binetem a spolupracovníky (Binet J.L. *et al.*, 1977), kteří později tento systém na základě multivariantní analýzy prognostických faktorů zjednodušili a navrhli systém o 3 stádiích, označovaných A-C (**tabulka 2**) (Binet J.L. *et al.*, 1981).

Tabulka 2. Klinický staging CLL dle Raie a dle Bineta a jeho prognostický dopad podle původních publikací.

System	Skupina	Stádium	Klinické rysy	Medián přežití
Rai	Nízké riziko	0	Pouze lymfocytóza	> 150
	Střední riziko	I	Lymfocytóza + zvětšené uzliny	101
		II	Lymfocytóza + zvětšená játra nebo slezina	71
	Vysoké riziko	III	Lymfocytóza + anemie (Hb < 11, Hkt < 33)	19
		IV	Lymfocytóza + trombopenie (< 100)	19
Binet		A	Postižení < 3 oblastí (Hb > 10, Tr > 100)	nesnížen
		B	Postižení 3 a více oblastí (Hb > 10, Tr > 100)	94
		C	Anemie nebo trombopenie (Hb < 10, Tr < 100)	24

Hladina hemoglobinu (Hb) v g/dl, počty trombocytů (Tr) x 10⁹/l.

Vzhledem k tomu, že je populace stále častěji laboratorně vyšetřována, roste během let podíl pacientů, u nichž se zachytí CLL náhodou, kdy je onemocnění stále ještě v iniciálním stádiu a je asymptomatické – toto indolentní období může trvat mnoho let. Pro predikci chování onemocnění a reakci na eventuální terapii bylo a je věnováno veliké úsilí hledání prognostických markerů, jež umožňují odlišit v časném stadiu choroby skupinu pacientů, u kterých lze očekávat mírný průběh od skupiny s rychle progredující nemocí.

Pokročilost onemocnění může odrážet například co nejpřesnější kalkulace celkové nádorové nálože (total tumor mass, TTM) TTM skóre (to je 2. odmocnina počtu lymfocytů + velikost největší uzliny + přesah sleziny přes žeberní oblouk v cm) (Jaksić B., Vitale B., 1981). Hodnota skóre ≥ 9 je spojena s horší prognózou. Dalším významným prognostickým kritériem je histopatologie kostní dřeně (Pileri S.A. *et al.*, 2004; Rozman C. *et al.*, 1981; Pangalis G.A. *et al.*, 1984). Pacienti s nodulárním/intersticiálním/smíšeným typem infiltrace žijí podstatně déle, než ti s difuzním typem. Další prognostické markery vyjadřují spíše aktuální rychlost progresu onemocnění v daném okamžiku. Sem patří například čas zdvojení absolutního počtu lymfocytů (zdvojovací čas lymfocytů LDT, rozhraní 1 rok, dle některých půl roku), mitotický index a další markery proliferace, například exprese proliferačního nukleolárního antigenu (PCNA), proliferačního Ki-67 antigenu, biochemické markery (zvýšení sérové hladiny laktádehydrogenázy - LD, thymidin kinázy -s-TK, β_2 -mikroglobulinu, urátů). Imunofenotypových markerů byla popsána řada, z nichž

nejpoužívanějšími je negativní prognostický dopad exprese CD38 a ZAP-70 (Hamblin T.J. *et al.*, 2002; Orchard J.A. *et al.*, 2004; Crespo M. *et al.*, 2003; Rassenti L.Z. *et al.*, 2004; Wiestner A. *et al.*, 2003).

Literární údaje svědčí pro to, že rovněž délka telomér a aktivita enzymu telomerázy mají vztah k prognóze a odpovědi na terapii a tyto dva parametry řadí mezi potenciální prognostické faktory u pacientů s CLL (Roos G. *et al.*, 2008). Teloméry jsou koncové struktury chromosomů, tvořené repetitivními DNA sekvencemi (TTAGGG)_n a specifickými proteiny, vázícími se k DNA. Jejich základní úlohou je udržování stability chromosomu, ochrana před degradací nukleotidů a koncovými fúzí chromosomů, uplatňují se rovněž při kontrole replikace buňky. Průměrná délka lidských telomér se pohybuje v rozmezí 5–15 kbp, při každém buněčném dělení dochází ke zkracování telomér v důsledku nekompletní replikace lineárních konců chromosomů. Když zkrácení telomér dosáhne kritického bodu (3–4 kbp), buňka již neproliferuje, dochází ke stárnutí a apoptóze. Předpokládá se, že ke zvýšenému zkracování telomér dochází v průběhu maligní transformace buňky což by důsledek nestability DNA. Alterované buňky se zkrácenými teloméry jsou rychle eliminovány, avšak malé množství může přežít a dát tak vznik klonu se zvýšenou proliferační aktivitou (Blackburn E.H., 2001; Iwama H. *et al.*, 1998). To je obvykle provázeno aktivací enzymu telomerázy – reverzní transkriptázy, syntetizující telomerické oblasti. Zatímco ve zralých buňkách je aktivita telomerázy velmi nízká, přibližně v 90 % solidních nádorů byla prokázána zvýšená aktivita tohoto enzymu, což patrně přispívá k procesu nádorové transformace buňky (Hiyama E., Hiyama K., 2007).

Důležitý z hlediska prognostiky CLL je mutační stav daného *IgVH* genu, který představuje procento odlišnosti nukleotidů zachycené podrodiny *IgVH* ve srovnání s její germinální linií, tedy stavem před somatickou mutací. Za mutované (M-CLL) se považují CLL s > 2 % mutací *IgVH* genu, zatímco nemutované (unmutated = U-CLL) jsou CLL s 0-2 % mutací (Stilgenbauer S. *et al.*, 2002; Damle R.N. *et al.*, 1999; Hamblin T.J. *et al.*, 1999). Nemutovaný stav *IgVH* (*IgVH* stejné nebo velice podobné germinální sekvenci) je spojen s horší prognózou, tedy s kratším přežitím pacientů s CLL (Schwarz J. *et al.*, 2006; Hamblin T.J. *et al.*, 2002; Orchard J.A. *et al.*, 2004; Crespo M. *et al.*, 2003; Rassenti L.Z. *et al.*, 2004; Wiestner A. *et al.*, 2003).

Další faktory mohou být spíše funkcí biologické povahy nádoru (CLL), a na tomto poli si významné postavení získala molekulární cytogenetika.

2.4.1. Cytogenetika

Problematikou významu cytogenetických analýz u CLL jsme se zabývali v českém přehledovém článku (Berková a Michalová, 2010 – Příloha 1).

CLL se vyznačuje přítomností klonálních chromosomových aberací, a to častěji kvantitativními změnami v DNA sekvencích spíše než balancovanými translokacemi. Tyto aberace jsou obtížně detekovatelné pomocí pruhovacích technik při klasickém cytogenetickém vyšetření vzhledem k nízkému mitotickému indexu patologických B-lymfocytů a k jejich často kryptickému charakteru. Prvotní práce popisující stimulaci dělení CLL buněk B-mitogeny (například Dextran sulfát – DxS, Epstein-Barr virus - EBV, lipopolysacharid z *Escherichia coli* – Eco LPS, pokeweed mitogenem - PWM, tetradekanoylforbolacetát – TPA, fytohemaglutinin - PHA) pro získání informativních mitos v cytogenetických kultivacích se objevily na konci 70. let. Tímto postupem byla na počátku 80. let odhalena první rekurentní chromosomová změna u CLL - trisomie chromosomu 12, dále delece chromosomové oblasti 13q14 a přestavba 14q32. S dalším rozvojem jak molekulárně cytogenetických (fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH, komparativní genomová hybridizace - CGH a hlavně její čipová varanta – arrayCGH nebo aCGH), tak i kultivačních metod (stimulace ligandem CD40 nebo imunostimulačními CpG oligonukleotidy v kombinaci s interleukinem IL-2) byly identifikovány další rekurentní chromosomové aberace - delece 17p13, 11q22.3, 6q21 a trisomie 3q26 a 8q24.

Zejména metoda FISH zaznamenala na přelomu 80. a 90. let průlom ve studiu změn na úrovni DNA tím, že umožnila analýzu genomových odchylek i v interfázních jádrech. Zásadní práci publikovali v roce 2000 Hartmut Döhner a kolektiv (Döhner H. *et al.*, 2000). V této studii sledovali nejen četnost výskytu všech dříve popsanych aberací u 325 pacientů s CLL metodou interfázní FISH, ale také korelovali jednotlivé molekulárně cytogenetické nálezy s klinickými parametry a průběhem onemocnění. Definovali pět rozdílných kategorií na základě výsledků FISH analýz: delece 17p, delece 11q, trisomie 12, normální nález a delece 13q. U jednotlivých skupin se zásadně lišil medián celkového přežití (OS), jak ukazuje **tabulka 3**.

Tabulka 3. Přehled nejčastějších chromosomových aberací se stručnou charakteristikou jednotlivých změn (podle Döhner H. *et al.*, 2000).

Chromosomová aberace	Frekvence zjištěná metodou FISH (%)	OS	TFS	Gen	Klinický význam
Delece 11q22-q23	10 - 20	79	13	ATM	lymfadenopatie
Trisomie 12	10 - 25	114	33	neznámý	?
Delece 13q14	40 – 60	133	92	miR15a, miR16-1	velmi příznivá prognóza
Delece 17p13	10 - 15	32	9	TP53	chemorezistence

OS – overall survival, celkové přežití; TFS – treatment free survival, doba do zahájení terapie

Klíčová byla hlavně identifikace vysoce rizikové skupiny pacientů s delecí 17p13.1 a 11q22.3 (tak zvaných high-risk delecí). Toto hierarchické prognostické rozdělení je platné dodnes, přičemž při kombinaci více nalezených aberací rozhoduje o zařazení do rizikové skupiny ta nejnejpříznivější. Tyto výsledky byly nezávisle potvrzeny dalšími studiemi (Dewald G.W. *et al.*, 2003; Shanafelt T.D. *et al.*, 2006). Nutno zmínit, že žádná z těchto čtyř aberací není specifická pro CLL, a může tak být detekována u všech typů lymfoproliferativních malignit.

2.4.1.1. Delece 13q14

Delece dlouhých ramen chromosomu 13 je vůbec nejčastější chromosomovou změnou, která se vyskytuje u více než 50% pacientů s CLL, z toho asi u třetiny ještě společně s další aberací. Zatímco ostatní rekurentní delece analyzované u této choroby jsou v naprosté většině monoalelické, delece 13q14 je asi u čtvrtiny nemocných detekována jako bialelická nebo jako kombinace monoalelické i bialelické. Několik studií jednoznačně potvrdilo, že monoalelická delece 13q14 přítomná jako jediná aberace predikuje příznivý průběh díky velmi pomalé progresi choroby, dokonce ještě příznivější než normální nález všech sledovaných lokusů (Döhner H. *et al.*, 2000). Prognostickou implikací bialelické delece 13q14 se mnoho publikací nezabývá, nicméně jedna studie stejně pozitivní prognostický dopad, jaký má samostatná monoalelická delece 13q14, vyvrací (Chena C. *et al.*, 2008). Rozsah delece a místa zlomu se u jednotlivých nemocných mohou lišit, avšak delece vždy zahrnuje pruh 13q14.3. Četnost delecí a ztráta heterozygosity v oblasti 13q14 u pacientů s CLL ukazuje na možnou inaktivaci nádorového supresorového genu, který má

signifikantní úlohu v patogenezi CLL, avšak stále nebyl nalezen. První studie byly zaměřeny na průkaz přítomnosti či ztráty RB-1 genu, který je v oblasti 13q14.3 lokalizován. Pomocí FISH však byla monoalelická delece *RB-1* genu prokázána pouze u 21% nemocných (Döhner H. *et al.*, 1994) a homozygotní delece byla detekována jen sporadicky (Liu Y. *et al.*, 1992). Ani další studie jiných kandidátních tumor-supresorových genů neprokázaly jasnou souvislost s etiopatogenezí choroby. Stále více pozornosti je věnováno malým nekódujícím micro-RNAs (miR-15a a miR-16-1) lokalizovaným v této oblasti a jejich potenciálnímu vlivu na regulaci exprese antiapoptického proteinu bcl-2 (Cimmino A. *et al.*, 2005).

2.4.1.2. Trisomie 12

Nejčastější klonální numerickou změnou u CLL je trisomie chromosomu 12, která je detekována u 10-25% pacientů. Ačkoli byla trisomie 12 identifikována jako úplně první rekurentní aberace u této choroby, její prognostický význam zůstává stále nejasný i přes množství publikovaných studií. Byla například prezentována spojitost této aneuploidie s atypickou morfologií a CD5 negativitou, se zvýšeným prolymfocytárním zastoupením, s pokročilejším onemocněním, geografickou variabilitou a kratší délkou celkového přežití, zatímco jiné studie tato pozorování nepotvrdily (Matutes E. *et al.*, 1996; Nair C.N. *et al.*, 1998; Dewald G.W. *et al.*, 2003; Juliusson G., Gahrton G., 1990; Hamblin T.J., 1997; Auer R.L. *et al.*, 1999; Lazaridou A. *et al.*, 2000; Stilgenbauer S. *et al.*, 2002). Stejně tak snahy objevit zodpovědné geny byly neúspěšné, i když variantní nálezy parciálních trisomií chromosomu 12 u některých pacientů odpovídají hypotéze, že geny důležité v patogenezi choroby jsou lokalizovány na dlouhých ramenech, a to v oblasti 12q13 až 12qter. Nicméně u zde lokalizovaných onkogenů *k-ras-2*, *int-1*, *MDM-2* ani u regulátoru buněčného cyklu *CCND2* nebyl význam v etiopatogenezi CLL prokázán (Haidar M.A. *et al.*, 1997). V poslední době je zvažován epigenetický mechanismus vlivu trisomie chromosomu 12. Zucchetto A. *et al.* (2013) popsali overexpresi CD49d (podjednotky integrinu se zásadní rolí v mikroprostředí CLL) u pacientů s trisomií 12 a dokladují, že tato exprese je regulována v závislosti na metylačním profilu kódujícího genu.

2.4.1.3. Delece 11q

Delece 11q22-q23 se vyskytuje u 10-20% nemocných s CLL (Döhner H. *et al.*, 1997) a již bylo zmíněno, že spolu s delecí 17p13 (zahrnující gen *TP53*) předpovídá rychlou progresi onemocnění a tedy velmi špatnou prognózu. Ve snaze najít aberovaný tumor-supresorový gen související s patogenezí CLL se molekulární studie deletované oblasti 11q22-q23 zaměřily na gen *ATM* (11q22.3-q23.1), vzhledem k vysoké incidenci lymfoidních malignit u osob s autozomálně recesivně dědičným syndromem chromosomové nestability - ataxia teleangiectasia (AT). Co víc, protein *ATM* působí v signalizační dráze odpovědi na poškození DNA upstream od p53 (tedy fosforyluje proteiny p53, BRCA1, H2AX, cAbl, chk1 atp.) a bylo prokázáno, že defekty *ATM* mohou vést k narušení p53-dependetní apoptotické cesty (Pettitt A.R. *et al.*, 2001). Nicméně změna či úplná absence *ATM* genového produktu závisí na mutačním stavu druhé, nedeletované alely genu *ATM*. Studie mutační analýzy *ATM* u 72 případů s CLL a heterozygotní delecí 11q22.3 odhalila mutaci zachované alely v 36% (s vývojem choroby se toto procento zvyšuje) a potvrdila předpokládanou *in vitro* rezistenci těchto buněk k cytotoxickým chemoterapeutikům (Austen B. *et al.*, 2007). Další zajímavá studie se zabývala mimo jiné testováním *in vitro* sensitivity CLL buněk s delecí 11q22.3 k purinovému analogu fludarabinu a porovnáním s reakcí p53-defektních buněk, u kterých, jako jediných, byla prokázána signifikantní rezistence (Cejkova S. *et al.*, 2009). Defekty v genu *ATM* tedy nejsou zcela ekvivalentní vyřazení p53, neboť v buňce existují i jiné mechanismy aktivace p53. Z klinického pohledu mají pacienti s delecí 11q značnou lymfadenopatii, jsou mladšího věku a jsou to častěji muži.

2.4.1.4. Delece 17p13

Molekulárně genetické studie jednoznačně potvrdily úlohu tumor-supresorového genu *TP53* u CLL pacientů s monoalelickou delecí 17p, jejíž četnost stanovená metodou FISH se pohybuje v raných stádiích mezi 5-7 %, ovšem u pokročilých a rezistentních onemocnění dosahuje až 40 %. Na rozdíl od situace popsané u delece genu *ATM*, mutace nedeletované alely genu *TP53* se vyskytuje u naprosté většiny nemocných, ačkoli mutace bez delece a *vice versa* mají stejně špatný prognostický dopad (Zenz T. *et al.*, 2008). Pacienti s p53 abnormalitami velmi brzy progredují (do 1 až 2 let od diagnózy), mají nejkratší celkové přežití (3-4 roky) a umírají téměř vždy v souvislosti s onemocněním. Vzhledem k tomu, že terapie purinovými analogy (například fludarabinem) a alkylačními

látkami (například chlorambucilem) je založena na p53-dependentní apoptóze, pacienti s delecí / inaktivační mutací genu *TP53* jsou na takovou léčbu refrakterní. Navíc je přítomnost defektu p53 také spojena s transformací CLL do agresivnějších malignit (tak zvaný Richterův syndrom) (Rossi D., Gaidano G., 2009). Efekt chybění byť i jedné alely *TP53* demonstruje vzácný autozomálně dominantně dědičný Li-Fraumeni syndrom predisponující jedince k časným nádorovým onemocněním různého původu (leukémie, sarkomy, osteosarkomy a nádory prsu) a na druhou stranu, u mnohých malignit byla nalezena inaktivace proteinu p53. Obecně platí, že u jakéhokoli nádorového onemocnění, tato aberace přináší velmi nepříznivou prognózu.

2.4.1.5. Ostatní chromosomové změny

Terminální nebo intersticiální delece 6q jsou relativně často detekovány u lymfoidních proliferací obecně (u akutní lymfoblastické leukémie - ALL, NHL, SLL/CLL, prolymfocytární leukémie - PLL, MM). Mezi dalšími genomovými aberacemi je zmnožení 2p, parciální nebo úplná trisomie chromosomu 3, 8 nebo 18, a s vývojem nových metod i jejich rezolučních schopností lze předpokládat, že bude popsáno mnoho dalších. Důvodem, proč ani jedna z těchto změn nebyla zatím přijata mezi prediktivní faktory, je fakt, že se u CLL vyskytují vzácně (u méně než 5% nemocných), přičemž rozsah postižené chromosomové oblasti se v jednotlivých publikacích více či méně liší, stejně jako prognostický význam. V neposlední řadě se prozatím nepodařilo identifikovat geny důležité v patogenezi tohoto nádorového onemocnění.

Otázkou četnosti a významu strukturních cytogenetických abnormalit oblasti 14q32.33 (*IgH*) u CLL popisovaných v literatuře se zabýváme dále.

Na rozdíl od mutačního stavu *IgVH*, který se nemění, jedná-li se o klonálně stejné onemocnění (Stevenson F.K., Caligaris-Cappio F., 2004), cytogenetické aberace mohou být získány kdykoli v průběhu onemocnění. Klonální vývoj (KV), zjištěný opakovaným vyšetřením metodou FISH je častější, než se původně předpokládalo (Shanafelt T.D. *et al.*, 2006). Tento jev je obzvláště důležitý v případě, že následná FISH odhalí získání high-risk aberace (delece *ATM* nebo *TP53* genu), kvůli negativnímu vlivu na účinnost léčby (Byrd J.C. *et al.*, 2006). Tím vyvstala otázka, zda se dá podle používaných prognostických faktorů předvídat vývoj CLL klonu u pacientů z určitých rizikových skupin.

2.5. Terapie

Rai a Binetův stážovací klinický systém a tradiční prognostické markery (TTM, typ infiltrace kostní dřeně, LDT, s-TK, β 2-mikroglobulin) vyjadřují nádorovou nálož u pacientů s pokročilou CLL, ale neposkytují žádnou informaci o variabilitě klinického průběhu, nejsou tedy použitelné pro predikci rychlé progresu u pacientů v časném stádiu onemocnění (Rai 0/1, Binet A). 80-90 % nemocných je diagnostikováno právě v časných stádiích a asymptomatictí pacienti mohou žít roky bez potřeby specifické terapie - přístup watch and wait (Hallek M. *et al.*, 2008). Od 70. let do současnosti vedly pokroky v samotné léčbě CLL i v podpůrné terapii k významnému prodloužení života (Thurmes P. *et al.*, 2008). Chemoimunoterapeutickým režimem volby, zahrnujícím purinový analog fludarabin, alkylační činidlo cyklofosamid a monoklonální protilátku anti-CD20 rituximab (režim FCR), lze dosáhnout kompletních odpovědí u 72 % pacientů (Tam C.S. *et al.*, 2008; Hallek M. *et al.*, 2010). U pacientů s delecí genu *ATM* bylo prokázáno, že zahrnutí cyklofosfamidů do léčebného režimu výrazně zlepšilo prognózu (Catovsky D. *et al.*, 2007; Hallek *et al.*, 2010), zatímco u delecí *TP53* se odpovědi na léčbu stále nedaří vylepšit a některé práce navrhují směřovat tuto skupinu rovnou k alogenní transplantaci (Catovsky D. *et al.*, 2007; Dreger P. *et al.*, 2007).

Léčba chemoimunoterapií s sebou však nese také nezanedbatelnou toxicitu, proto rozhodnutí koho léčit a kdy se stává tím nejzásadnějším (Bazargan A. *et al.*, 2012). V tomto odhadu agresivity choroby pomáhají nové ověřené biologické markery (mutační stav *IgVH*, chromosomové aberace), a seznam těch potenciálních stále roste.

3. Cíle práce

1. určit frekvenci cytogenetických a molekulárně cytogenetických aberací v našem souboru nemocných s CLL/SLL; porovnat nálezy s výsledky prognostických markerů a s klinickým průběhem nemoci; určit klinický význam nálezu aberací *IgH* genu; vyhodnotit, zda nálezy interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace z periferní krve mají dostačující výpovědní hodnotu ve srovnání s nálezy karyotypu kostní dřeně konvenční cytogenetickou analýzou

Hypotéza: Výsledky molekulárně cytogenetické metody FISH s panelem sond zaměřeným na čtyři nejčastější aberace u CLL a aberace genu *IgH* poskytují více informací než konvenční cytogenetika, ať již kvůli kryptickému charakteru aberací nebo sledování, že se buňky nádorových lymfoproliferací ve standardních cytogenetických kultivacích většinou nedělí.

2. význam vývoje klonu u CLL

Hypotéza: U opakovaných odběrů nemocných v průběhu choroby nezářídka dochází ke vzniku dalších aberací a tento vývoj je různý. Názory v literatuře se různí, proto jsme se také zabývali otázkou, zda lze tento klonální vývoj očekávat u nemocných s určitým rizikovým profilem a jaký má dopad na celkové přežití.

3. význam délky telomér a telomerázy u CLL

Hypotéza: Pro CLL je charakteristická akumulace klonu morfologicky zralých lymfocytů. V citované literatuře se uvádí, že délka telomér je ukazatel buněčného obratu a aktivita telomerázy je ve zralých buňkách velmi nízká. Analyzovali jsme tudíž, zda lze tyto dva parametry zařadit mezi prognostické faktory u CLL.

4. ověřit význam molekulárně cytogenetických metod u dalších jednotek NHL

Hypotéza: Nálezy mají význam pro diagnózu, diferenciální diagnostiku a prognózu.

4. Materiál a metody

4.1. Soubor pacientů

Od roku 1996 do konce roku 2013 bylo na našem pracovišti vyšetřeno 1686 pacientů (984 mužů a 702 žen, medián věku 64 let v rozmezí 32 až 90 let) s diagnózou suspektní CLL/B-NHL. Včetně opakovaných odběrů jsme provedli celkem 2370 cytogenetických a/nebo molekulárně cytogenetických analýz.

V předkládané práci jsme hodnotili v průběhu času různé soubory nemocných, tak jak vyplývá z výsledků jednotlivých kapitol.

4.2. Klasická cytogenetická analýza

Vzorky KD byly zpracovány podle standardních cytogenetických postupů po 24 hodinové kultivaci v médiu RPMI 1640 s přídavkem 10% fetálního telecího séra bez použití mitogenu (kolcemid, hypotonie – 0.075M KCl, fixace – metanol : kyselina octová 3:1). Fixovaná buněčná suspenze byla nakapána na podložní skla. Pro cytogenetickou analýzu byla použita metoda G-pruhování, vyhodnocení bylo provedeno pomocí počítačové analýzy obrazu IKAROS od firmy MetaSystems (MetaSystems, Altlußheim, Germany). U každého nemocného bylo v případě dostatečného množství dělicích se buněk vyhodnoceno 20 mitos a popsán výsledný karyotyp.

4.3. FISH

U preparátů KD (viz 4.2.) byla provedena i molekulárně cytogenetická metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), zatímco u nátěrů periferní krve (PK) byla provedena pouze FISH (odběry periferní krve zpracováváme bez kultivace a následného zrušení dělicího vřeténka kolcemidem, v suspenzích tedy nejsou mitosy).

Preparáty ze vzorků periferní krve byly připraveny bez předchozí kultivace, buněčná suspenze byla po působení hypotonického roztoku a fixace přímo nakapána na podložní skla.

Velmi tenké řezy (tloušťka okolo 5 μ m) bioptického materiálu fixovaného ve formalinu, zalitého do parafinu, byly nejprve deparafinizovány xylenem. Po pretreatmentu následovalo natrávení proteázou (doba trávení závisí na typu tkáně), dofixování v pufovaném formalínu a skla byla připravena k hybridizaci..

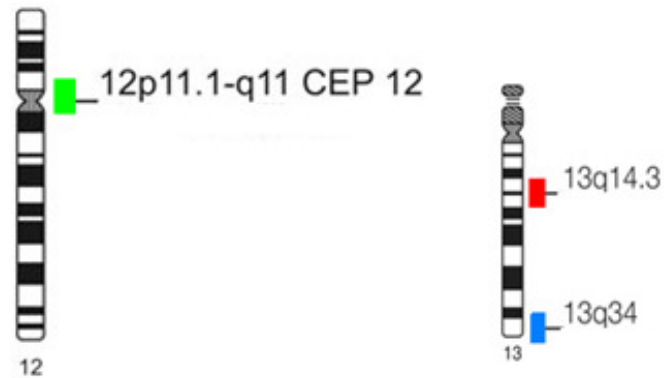
Metodou FISH za použití panelu komerčně dostupných DNA sond (CEP12, LSI D13S319/LSI 13q34, LSI TP53, LSI ATM, IgH BA, BCL6 BA, MYC BA, BCL2/IGH DF, CCND1/IGH DF, MYC/IGH DF; Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), byla analyzována přítomnost trisomie 12, delecce chromosomové oblasti 13q14.3, delecce genů *TP53* a *ATM* (dále „CLL FISH panel“), eventuálně zlomu genů *IgH*, *BCL6* a *MYC*, a translokací t(14;18)(q32;q21), t(11;14)(q13;q32) a t(8;14)(q24;q32). Pro detekci zlomu genu *IgH* byla později používána sonda ON IGH (14q32) Brake probes (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, Holandsko). Při FISH analýzách jsme postupovali podle návodů doporučených výrobcí příslušných DNA sond. Buňky byly podbarveny DAPI (4,6-diamid-2-fenylindol). U každé hybridizace bylo hodnoceno 200 interfázních jader. Obraz z fluorescenčního mikroskopu AxioImager Z1 (Zeiss, Jena, Německo) byl zpracován softwarem ISIS od MetaSystems.

Hladina významnosti, od které považujeme nálezy ze suspenzí za pozitivní (cut off), byla stanovena vyšetřením 10 osob s normálním karyotypem (hodnota průměru +3 SD) na 5 % u delecí a 2,5 % u trisomií, zlomů (sondy typu break-apart) a translokačních sond typu dual-fusion (Šindelářová L. *et al.*, 2005). U hodnocení FISH na parafinových preparátech je klíčové najít patologem popsany infiltrát.

Schémata používaných sond CLL FISH panelu a jednotlivé typické nálezy v interfázních jádrech jsou na **obrázcích 5 a 6**.

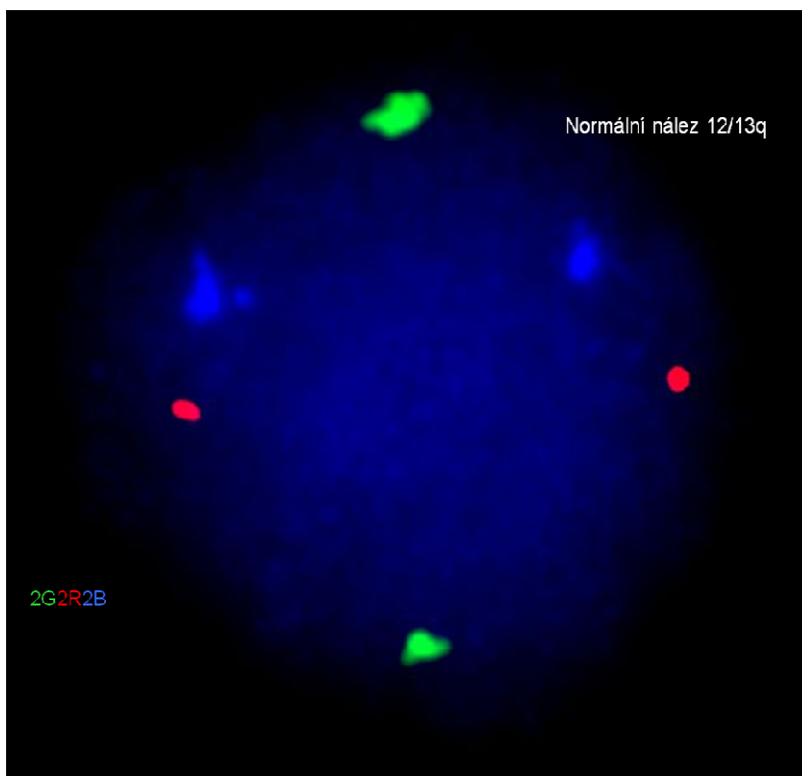
Obrázek 5. První FISH s kombinací sond pro detekci intersticiální delecce 13q14.3 a trisomie chromosomu 12. a) Schéma a značení sond na chromosomech 12 a 13, používaných v první hybridizaci (Abbott MolecularTM). b) normální nález, c) monoalelická delecce 13q14.3, d) bialelická delecce 13q14.3, e) trisomie 12. Zápisy GRB v obrázcích: počty signálů G = zelených, R = červených, B = modrých.

5a)

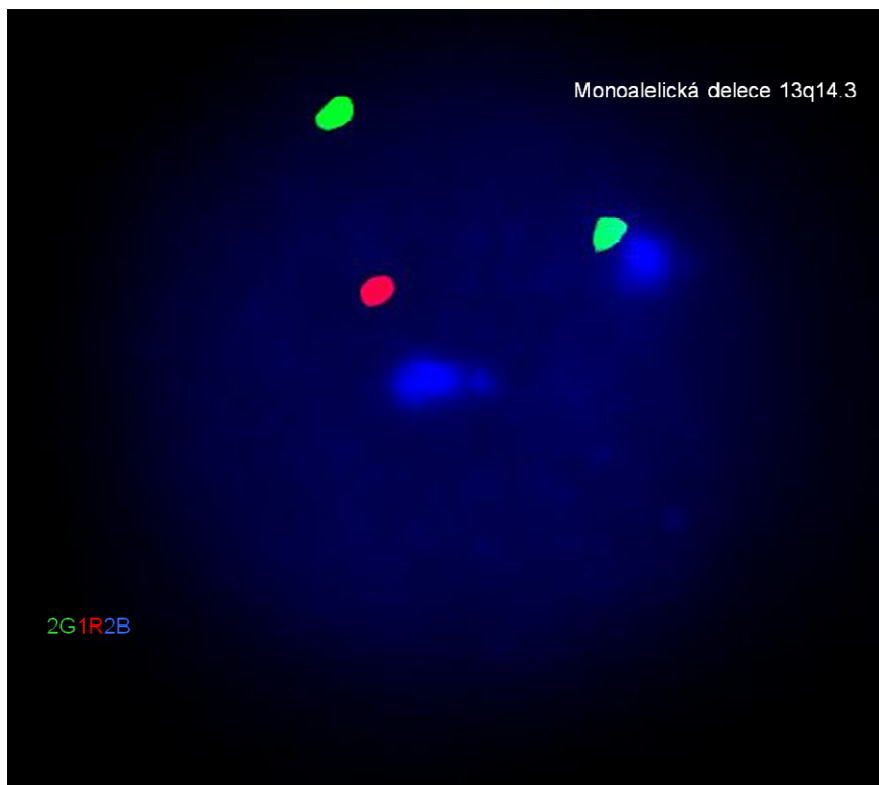


CEP = centromere enumeration probe - centromerická sonda

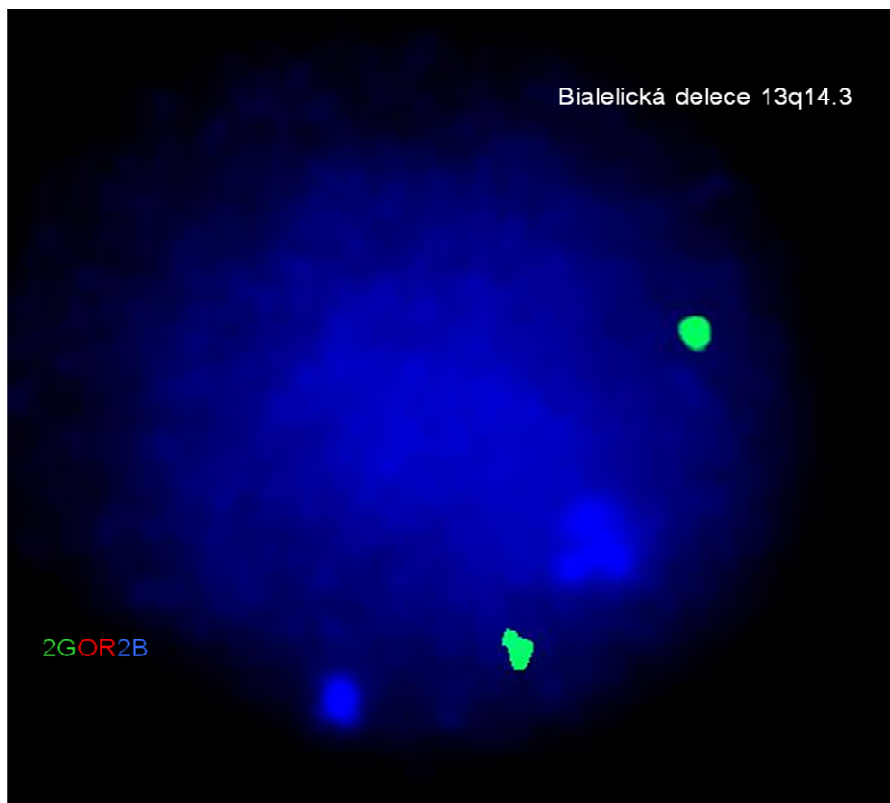
5b)



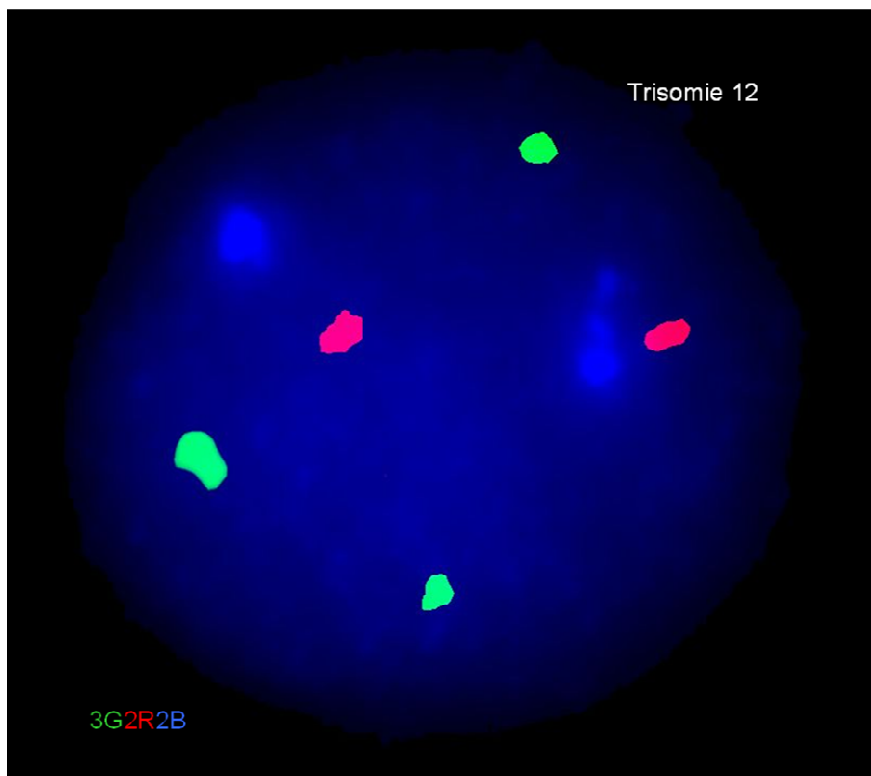
5c)



5d)

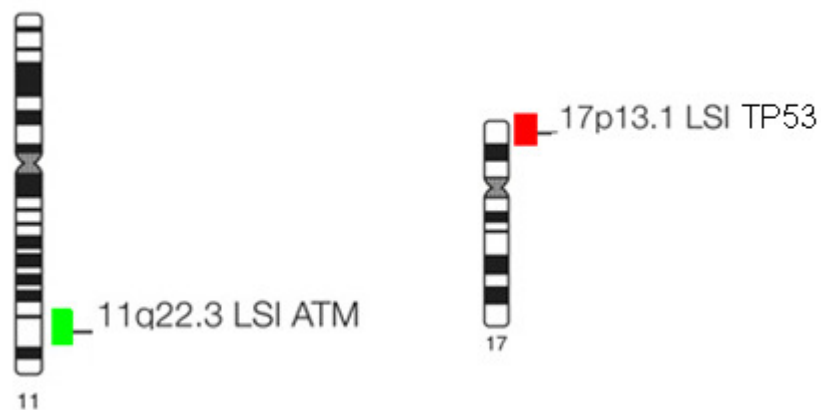


5e)



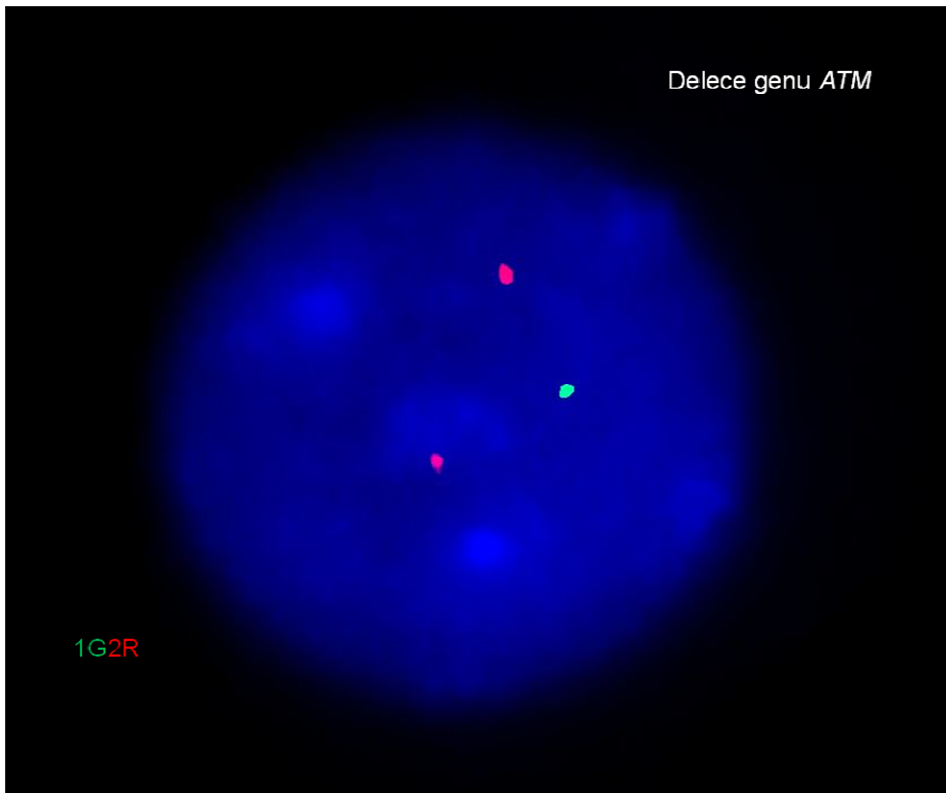
Obrázek 6. Druhá FISH s kombinací sond pro detekci delece genu *ATM* a delece genu *TP53*. a) Schéma a značení sond na chromosomech 11 a 17, používaných ve druhé hybridizaci (Abbott Molecular™). b) delece genu *ATM*, c) delece genu *TP53*. Zápisy GR v obrázcích: počty signálů G = zelených, R = červených.

6a)

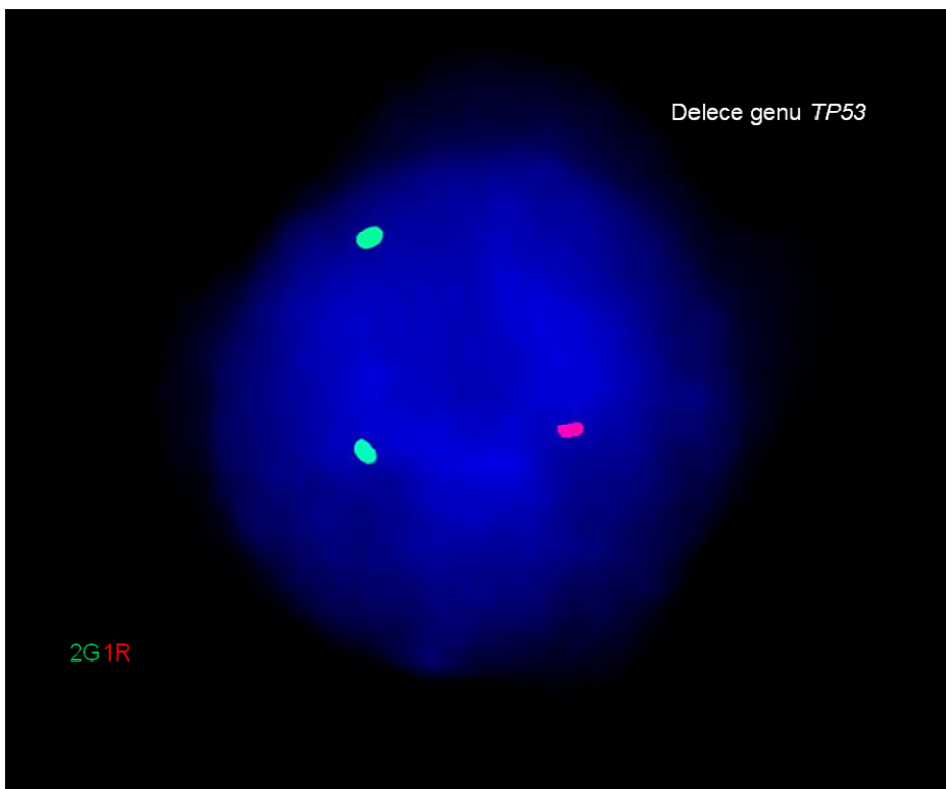


LSI = locus specific identifier – lokus-specifická sonda

6b)



6c)



4.4. Analýza délky telomér

Mononukleární buňky byly získány centrifugací v separačním médiu o hustotě 1,077g/l (Ficoll-Paque®, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko) z periferní krve u všech 66 nemocných. Kontaminující proteiny byly enzymaticky naštěpeny a odstraněny vysolením. Vysokomolekulární DNA byla pak z vodného prostředí získána precipitací ethanolem (modifikovaná metoda dle Millera). Délka telomér byla určena metodou Terminal Repeat Fragment (TRF) za použití neradioaktivní chemiluminiscenční techniky. Purifikovaná DNA byla štěpena restričními enzymy *Hinf*I a *Ras*I, fragmenty DNA byly separovány gelovou elektroforézou a přeneseny na membránu Southern blottingem. Následovala hybridizace s telomerickou sondou značenou digoxigeninem, specifickou pro telomerické sekvence. Délka telomér byla detekována chemiluminiscencí (TeloTAGGG Telomere Length Assay, Roche Diagnostics, Basel, Švýcarsko), a tzv. TRF-L index (délka telomér v kilobazích), byl určen na základě instrukcí výrobce. Normální délka telomér u kontrolní skupiny 18 zdravých dárců (medián věku 61 let) byla 6,7 kbp ($\pm 0,79$). Nižší hodnoty byly považovány za zkrácené.

4.5. Detekce telomerázové aktivity

Telomerázová aktivita byla detekována u 21 nemocných metodou kvantitativní TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) analýzy za využití kitu TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics). Tato metoda je založená na schopnosti telomerázy syntetizovat in vitro telomerické repetice na DNA substrát. Prvním krokem je prodloužení oligonukleotidu TS (Telomerase Substrate) o telomerické repetice (TTAGGG)_n, závislého na aktivitě alikvotu proteinového extraktu dodaného do reakce. Druhým krokem je amplifikace prodlouženého TS templátu společně s interním standardem pomocí PCR. Následně byly PCR produkty, ukotvené na mikrotitrační destičce díky afinitě biotinu a streptavidinu, hybridizovány s digoxigeninem značenou sondou a detekovány použitím protilátek proti digoxigeninu konjugovanému s křenovou peroxidázou a přidáním peroxidázového substrátu TMB. Telomerázová aktivita byla vyjádřena jako index TA a stanovena podle protokolu dodaného výrobcem vzhledem k internímu standardu. Jedná se o poměr absorbance ($A_{450\text{nm}}/A_{690\text{nm}}$) PCR produktu vzorku k absorbanci interního standardu po odečtení pozadí. Jako pozitivní TA byl považován vzorek s rozdílem absorbancí (ΔA) větším než dvojnásobek aktivity pozadí.

4.6. Imunofenotypizace

Imunofenotypizace byla prováděna ve FACS laboratoři ÚLBLD Všeobecné fakultní nemocnice v Praze na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton-Dickinson, La Jolla, CA, USA). Při měření periferní krve bylo načítáno 15 000 částic, při měření kostní dřeně pak 10 000 částic. Zastoupení sledovaných CD znaků u B-lymfocytů bylo hodnoceno v GATEu na CD19. Panel zjišťovaných markerů byl: CD5, CD20, CD23, CD38, CD45, CD14, CD10, CD11c, FMC7, CD79b, CD27, CD3, CD4, CD8, ZAP70, NK buňky, kappa a lambda řetězce. Za pozitivní expresi CD38 je standardně považován výsledek nad 30 % CD19 pozitivních lymfocytů, u ZAP70 pozitivity výsledek nad 20 %.

4.7. Stanovení mutace *IgVH* genů

Je prováděno v Laboratoři PCR diagnostiky leukémií ÚHKT. Hmotnostním gradientem Ficoll-Paq (o hustotě 1,077g/l) separované mononukleární buňky byly lyzovány, RNA izolována TriZolem (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a ta reverzně transkribována do cDNA (Superscript II; Invitrogen). cDNA byla následně amplifikována Ampli-Taq Gold polymerázou (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) v 6 jednotlivých reakcích pro detekci klonální proliferace v 7 *IgVH* rodinách. Postup amplifikace pomocí degenerovaných primerů byl popsán dříve (Peková S. *et al.*, 2005). Po purifikaci byly zachycené RT-PCR produkty v gelové elektroforéze dále sekvenovány pomocí Big Dye Terminator kitu v.3 pomocí sekvenátoru ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sekvence zachyceného *IgVH* genu byla porovnána s jeho germ-line konfigurací programem Ig BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast) a práh 2 % mutací (tj. 98 % homologie) byl zvolen k odlišení mutovaného a nemutovaného *IgVH* genu.

4.8. Statistické analýzy

Analýza kategorických dat ve frekvenčních tabulkách byla provedena testy závislosti – byl použit χ^2 nebo Fisherův test pro malé četnosti. Pro testování různých prognostických skupin byl zvolen neparametrický Mann-Whitneyův test pro dva nezávislé výběry. Byla provedena Kaplan-Meierova analýza přežívání a Mantel-Coxův test rovností funkcí přežívání pro celkové přežití (OS) a FISH stabilní přežití (FSS). Pro multivariantní analýzu byl použit vícerozměrný Coxův regresní model. Všechny analýzy byly provedeny na hladině významnosti 0,05 a P hodnoty byly nalezeny pomocí programů BMDP Statistical Software (Los Angeles, CA, USA).

5. Výsledky

5.1. Molekulárně biologická a molekulárně cytogenetická analýza nemocných s CLL

5.1.1. Komentář k práci Berková A., *et al.* 2008 (Příloha č. 2)

V retrospektivní studii zahrnující 146 pacientů s CLL byla cílem analýza chromosomových aberací, vyhodnocení jejich prognostického významu a korelace s expresí ZAP-70 a mutačním stavem *IgVH* genů. Nejčastější chromosomovou aberací byla ve shodě s našimi předchozími pracemi i údaji v literatuře delece 13q14 (65 %), spojená s příznivou prognózou. Neprokázali jsme prognostický význam nálezu trisomie 12, přítomné u 12 % nemocných, naopak delece genů *TP53* (17 % nemocných) a *ATM* (15 % nemocných) byly potvrzeny jako nepříznivý prognostický ukazatel, a to především ve spojení s nemutovaným stavem *IgVH* genů. Z našich výsledků rovněž vyplynulo, že pravděpodobnost progresse onemocnění byla výrazně vyšší ($p=0,05$) u pacientů s vyšším Rai stadiem, s přítomností delece *ATM* a *TP53* genu, pozitivitou ZAP-70 a nemutovaným stavem *IgVH* genů, příznivým prognostickým faktorem byla naopak přítomnost delece 13q. Věnovali jsme se i otázce významu nálezu parciálních nebo úplných delecí variabilního segmentu *IgH* genu, které jsme detekovali u 20 % pacientů (29/146 pacientů) u nichž jsme z mutační analýzy *IgVH* znali i vybraný *VH* gen. Vzhledem k prokázané korelaci distální hranice delece *IgVH* a mutační analýzou zjištěné lokalizace *VH* segmentu v zárodečné linii CLL klonu se jedná o průvodní „fyziologický“ jev provázející somatickou rekombinaci *V-D-J* úseků bez jakéhokoliv vlivu na pacientovu prognózu.

Obrázek 7. z této práce ukazuje distribuci delece genu *TP53*, *ATM* a delecí *IgVH* ve skupinách se stabilní a progresivní chorobou:

	Disease status					
	Stable		Progressive		Mann-Whitney P	
	No.	%	No.	%		
deletion of p53 only	0	52	100,00%	42	91,30%	0,031
	1	0	0,00%	4	8,70%	
deletion of ATM only	0	52	100,00%	43	93,48%	0,063
	1	0	0,00%	3	6,52%	
deletion or partial deletion of variable segment of IgH gene	0	42	80,77%	35	76,09%	0,575
	1	10	19,23%	11	23,91%	

S odstupem několika let však vidíme tuto publikaci také kriticky. Ve snaze určit, zda nesouvisí aberace *IgH* genu zjištěných metodou FISH s jakoukoli aberací prokázanou CLL FISH panelem, jsme porovnávali jednotlivé nálezy bez hierarchického zápisu možných kombinací nalezených změn. V této práci jsme místo vlivu FISH aberací na standardní parametry přežití bez progresu (PFS) a celkového přežití (OS) použili rozdělení na skupinu nemocných se stabilní a progredující chorobou. U 11 pacientů se zjištěným zlomem *IgH* genu (indikujícím účast v translokaci) jsme nehledali partnerský translokační gen, což je zásadní informace v diferenciální diagnostice suspektní CLL / B-NHL, obzvláště při cytologické a imunofenotypové variabilitě nálezu.

5.1.2. Porovnání nálezů klasické cytogenetiky a FISH

V průběhu doby jsme rozšířili soubor nemocných a zaznamenávali jsme výsledky získané jak konvenční cytogenetickou analýzou, tak metodou FISH.

Karyotyp jsme vyšetřili pomocí G-pruhování u 794 pacientů s diagnózou B-NHL a suspektní CLL. S opakovanými odběry KD jsme provedli celkem 979 cytogenetických analýz (zároveň bylo u všech odběrů KD provedeno i vyšetření CLL FISH panelem).

Nálezy reflektují již zmíněnou nízkou mitotickou aktivitu CLL buněk ve standardních, krátkodobých cytogenetických kulturách bez mitogenu – u 173/979 (18 %) vzorků nebyly nalezeny žádné hodnotitelné mitosy (výsledky tedy vztahujeme k 806 nálezům po odečtení 173 neinformativních analýz) a u 687/806 (85 %) jsme prokázali normální karyotyp.

V 54/806 karyotypech (6,7 %) jsme našli stejnou aberaci / aberace jako ve FISH (bez ohledu na kombinace): 25x trisomie 12, 24x delecí 11q, 22x delecí 13q a 3x delecí 17p. Jiná abnormalita karyotypu (delecí 4p, 5q, 6q, 20q a další) byla popsána ve 43 případech.

Komplexní změny karyotypu jsme prokázali u 20 pacientů (2,5 %). V době cytogenetického nálezu komplexního karyotypu však byl histologickým vyšetřením diagnostikován sekundární myelodysplastický syndrom (sMDS – z útlumu krvetvorby po léčbě) v 7 případech, u jednoho pacienta Burkittův lymfom (při diagnóze), a u jednoho nemocného nádorová duplicita s infiltrací KD agresivním anaplastickým velkobuněčným T-lymfomem (CLL v remisi). V souvislosti s CLL byl prokázán Richterův syndrom s transformací do DLBCL ve 3 případech (jednou s delecí *TP53*, dvakrát s delecí genu

TP53 i *ATM*). U zbylých 8 nálezů komplexního karyotypu s diagnózou CLL byla metodou FISH prokázána delece genu *TP53* v 6 případech, delece genu *ATM* u 1 a delece *ATM* i *TP53* také u 1 pacienta. Tedy shrnuto, ve všech případech souvisejících s CLL byly komplexní změny karyotypu určeny ve FISH kategorii high-risk, u všech pacientů (kromě jednoho) s delecí genu *TP53*.

Většina výsledků karyotypu u lymfoproliferací při kultivace bez mitogenu byla negativní a značné procento neinformativní (na rozdíl od dysplázií a proliferací myeloidních buněk, kde je situace naprosto opačná - viz nálezy komplexních karyotypů). S vývojem cytogenetických technik *in situ* hybridizace (tedy cíleném hodnocení aberací v nedělicích se jádrech), díky určení prognostického významu aberací u CLL a diagnostických translokací u některých NHL, metod imunofenotypizace stejně jako diagnostických kritérií, se postupně dostalo vyšetření CLL buněk separovaných z PK do běžné praxe i do současné klasifikace WHO.

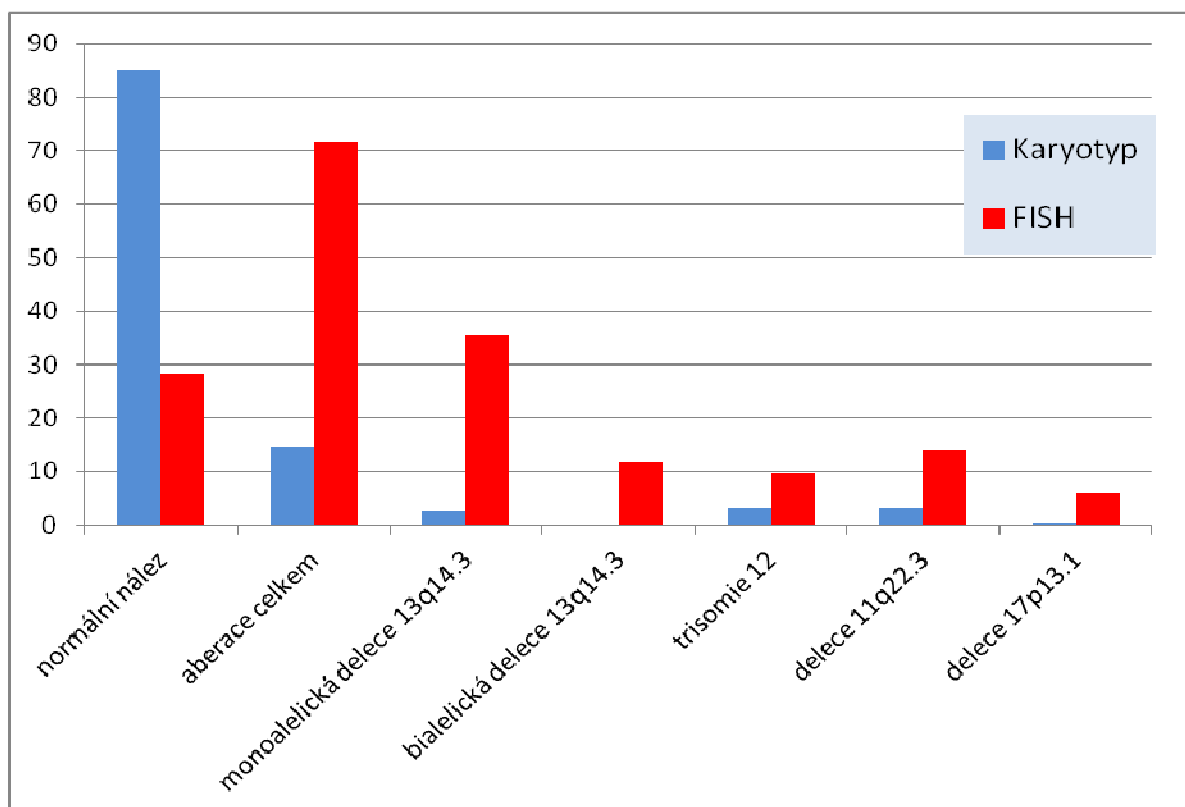
FISH

FISH, zaměřená na detekci čtyř nejčastějších aberací u CLL - tedy delecí 13q14.3, trisomii chromosomu 12 a delecí genů *ATM* a *TP53* (CLL FISH panel), byla provedena u 1686 nemocných s diagnózou suspektní CLL nebo B-NHL. Včetně opakovaných odběrů u již vyšetřených pacientů jsme provedli celkem 2370 FISH analýz. Číslo zahrnuje jak uvedené odběry KD, tak PK.

Pro ilustraci záchytu aberací klasickou cytogenetikou v porovnání s FISH uvádíme četnost a procenta jednotlivých aberací bez ohledu na opakované odběry, kombinaci nálezů a fázi onemocnění. V 1700 případech (72 %) byla metodou FISH detekována minimálně jedna ze čtyř nejčastějších aberací u CLL, a to: 843x monoalelická delece 13q14.3 (35,6 %), 278x bialelická delece 13q14.3 (11,7 %), 329x delece 11q22.3 (13,9 %), 228x trisomie 12 (9,6 %) a 144x delece 17p13.1 (6,1 %).

Porovnání záchytu aberací je zobrazeno na **obrázku 8**.

Obrázek 8. Procentuální záchyt aberací klasickou cytogenetikou bez stimulace v porovnání se záchytem aberací metodou FISH.



CLL FISH panelem jsme také detekovali pro CLL/SLL několik netypických nálezů (celkem u 38 pacientů), tedy jiných, než je intersticiální mono-/bialelická delece 13q14.3 a trisomie 12. Konkrétně šlo o monosomii chromosomu 13 u 25 pacientů, delecii oblasti 13q34 (se zachováním oblasti 13q14.3) u 10 pacientů a monosomii chromosomu 12 u 3 pacientů z 1686. Díky imunohistochemické pozitivitě cyklinu D1 a prokázané translokaci t(11;14)(q13;q32) byla diagnóza reklasifikována na MCL u 30 nemocných. U dvou šlo o diagnózu DLBCL, u jednoho pacienta o FL. Zbylým pěti pacientům zůstala diagnóza CLL.

Netypické FISH nálezy jsou u CLL extrémně vzácné, jak naznačují naše výsledky, kdy jsme některé z atypických nálezů pozorovali pouze u 5/1686 nemocných (0,3 %). Nápadná je však souvislost s jiným typem B-NHL.

Pro detekci přítomnosti translokací *IgH* genu jsme FISH se sondou *IgH* break-apart (která umožňuje zjistit účast *IgH* v translokaci bez informace o translokačním partnerském genu) provedli celkem u 979 pacientů a translokaci *IgH* jsme zjistili u 89 z nich (9 %). U 24 (27 %) se nám nepodařilo druhý partnerský gen účastný v translokaci najít (hledány

translokační geny *CCND1*, *BCL2*, *BCL6* a *MYC*). Klinická data máme od 15 z nich a ve 12 případech se jedná skutečně o CLL, u dvou o Richterovu transformaci do DLBCL a u jednoho pacienta vlasatobuněčnou leukémií (HCL). Translokaci t(8;14)(q24;q32) jsme prokázali u 3 pacientů, avšak u jedné nemocné nešlo o gen *MYC* (diagnóza CLL, bez aberací v CLL FISH panelu), u zbylých dvou ano, což vedlo ke změně diagnózy na BL. U 7 z 89 (7,7 %) jsme určili translokaci t(14;18)(q32;q21). V těchto případech je rozhodující imunohistochemický nálezn v histologickém vyšetření, který je hodnocen v závislosti na počtu typických znaků (atypická CLL s translokací *IgH/BCL2* versus atypický FL). Jiná situace je u MCL, kde je translokace t(11;14)(q13;q32) považována za primární genetickou událost vedoucí k overexpresi cyklinu D1 (a k jeho imunohistochemické pozitivitě v bioptickém materiálu). Díky imunofenotypové i cytologické podobnosti s CLL byla leukemizovaná varianta MCL detekována až metodou FISH průkazem translokace t(11;14)(q13;q32) u 55 pacientů se suspektní CLL (62 %). Protože se léčebné postupy u MCL a CLL liší, je odlišení těchto dvou onemocnění jedním z nejdůležitějších cytogenetických úkolů v diferenciální diagnostice B-NHL.

Diskuse:

Fenomén absence informativních mitos ve standardních cytogenetických kulturách (bez mitogenu) je onkocytogenetikům již několik desetiletí dobře znám nejen u CLL, ale u všech leukemizovaných NHL, s výjimkou vzácných, vysoce agresivních lymfoproliferací. Přehled našich zkušeností a veškeré literatury na téma stimulované kultivace jsme zařadili vzhledem k důležitosti v hodnocení klonálního vývoje u CLL v následující kapitole 5.2. Dříve zmiňované kultivace s mitogeny jako DxS, EBV, Eco LPS, PHA a pokeweed mitogenem (PWM) v 80. letech sice přinesly výsledky: 391/433 (90 %) hodnotitelných mitos a 218/391 = 56 % klonálních chromosomových změn (Juliusson G. *et al.*, 1990), ještě výraznější záhyt aberací však naznačila původní, výborně teoreticky odůvodněná práce německých autorů, postupem kultivace s imunostimulačními CpG-oligonukleotidy (CpG) a interleukinem-2 (IL-2) (Decker T. *et al.*, 2000). Další německá skupina zabývající se CLL (Haferlach C. *et al.*, 2007) poté publikovala výsledky 500/506 (99 %) hodnotitelných karyotypů ze 72 hodinové kultivace s CpG/IL-2, se záhytem 415/500 (83 %) případů s aberacemi. Z těchto mělo 82/415 pacientů (20 %) komplexní změny karyotypu, definováno jako 3 a více chromosomových změn. Při obvyklém rozložení aberací zjištěných CLL FISH panelem (delece 13q14 57 %, trisomie 12 14 %, delece *ATM* 12 % a delece *TP53* 7 %) je překvapivé, že delece *TP53* byla detekována pouze u 23 z 82

pacientů s komplexním karyotypem. Tento postup (a varianty) aplikovalo několik onkocytogenetických laboratoří z celého světa včetně naší. Mezi jinými řešenými tématy jsme v rámci společného projektu ÚHK a VFN Praha porovnávali informativitu výsledků získaných klasickou cytogenetickou analýzou nestimulovaných buněk, stimulovaných buněk (CpG/IL-2 na 72 hodin) a metodou FISH u 50 odběrů KD pacientů s CLL. Aberace jsme našli ve 20 ze 42 (48 %) hodnotitelných vzorků se stimulovaným růstem, avšak nálezy byly provázeny přítomností neklonálních aberací a interpretace byla proto složitá až nemožná (Závěrečná zpráva projektu NR9244/2007, řešitel RNDr. Březinová J., Ph.D.). Na rozdíl od naší zkušenosti, Shi M. *et al.* (2013) porovnali záchyt aberací u 81 případů s CLL třemi druhy kultivací (s CpG/IL-2 na 72h, s přidavkem pokeweed mitogenu PWM na 72h a bez mitogenu na 24h). Nejvyšší záchyt aberací získali kultivací s CpG/IL-2, a to 53 % klonálních abnormálních nálezů (přičemž u 9 komplexní karyotyp – 3x s delecí *TP53* a 4x s delecí *ATM*). Štěpanovská K. *et al.* (2013) kultivací s CpG/IL-2 našli aberace u 243 z 307 pacientů, komplexní změny karyotypu u 103 případů (42 %), zatímco FISH výsledky u těchto pacientů ukázaly 40 x pouze delecí 13q14, 28 x delecí *ATM* a 24 x delecí *TP53*.

Tyto výsledky záchytu aberací klasickou cytogenetikou po stimulované kultivaci však přinášejí evidentní rozpor mezi dlouhodobě platným, hierarchickým prognostickým rozdělením podle čtyř nejčastějších FISH aberací a nálezem komplexních změn karyotypu – častá je situace, kdy je ve FISH panelu pouze delecce 13q14 (nebo vše normální), ale nález komplexního karyotypu řadí pacienta do high-risk skupiny, zatímco průběh choroby je indolentní. Od již citované práce z roku 1990 (Juliusson G. *et al.*, 1990), ve které autoři popsali kratší přežívání s každou další aberací v karyotypu, se už žádná skupina nezabývala definicí a prognostickým významem komplexního karyotypu u CLL danou metodou, jak je tomu například v trvající diskuzi u akutní myeloidní leukémie (Grimwade D. *et al.*, 2010), nebo u myelodysplastických syndromů (Schanz J. *et al.*, 2012, Zemanova Z. *et al.*, 2014).

Například pro klinickou práci, zabývající se negativním prognostickým vlivem nálezu komplexního karyotypu u alogenně transplantovaných pacientů s CLL, použila jedna ze spoluautorů genetička dr. Heerema jako definici komplexního karyotypu 5 a více aberací po kultivaci vzorků s přidavkem CpG, PWM a TPA, což naznačuje, že při definici komplexního karyotypu jako 3 a více změn nebyl tento negativní prognostický vliv statisticky prokázán (Jaglowski S.M. *et al.*, 2012). Ovšem při stimulaci s TPA jsou klastogenní účinky (navozující zlomy v dsDNA) již známy (Ostürk S. *et al.*, 2000).

Namístež je i otázka bezpečnosti kultivace s CpG/IL-2, zda tento postup neindukuje *de novo* aberace v B buňkách. Tento problém řešila doposud pouze jedna americká práce (Wu X. *et al.*, 2011), kteří neprokázali kultivací s CpG (ale bez IL-2) u 24 zdravých dospělých jedinců žádné klonální aberace ani konvenční cytogenetikou ani metodou FISH, nicméně u 9 případů zaznamenali výskyt neklonálních aberací. Vzhledem k tomu, že se používané metody stimulace mezi laboratořemi výrazně liší ať už dobou kultivace nebo přidanými mitogeny / stimulanty, bylo by vhodné ověřovat *in vitro* účinek těchto postupů při konkrétních kultivačních podmínkách pro vyloučení klastogenicity.

Také reproducibilitu nálezů dokladuje jediná práce (Heerema N.A. *et al.*, 2010) mezilaboratorní validace 12 CLL vzorků se stejným výsledkem ve všech 4 laboratořích, ovšem při kultivaci CpG/IL-2 a s přidavkem interleukinu IL-15. Tuto variantu stimulace CLL buněk však zmiňuje pouze tato studie. Ojedinělou práci recentně publikovali Urbankova H. *et al.* (2014). Porovnávali u 50 pacientů nálezy klasické cytogenetiky získané dvěma druhy stimulované kultivace (TPA a CpG/IL-2), FISH analýz a výsledky nestimulované arrayCGH. Hodnotitelné mitosy získali u 37/50 případů a u 23/37 detekovali aberantní karyotyp. Přestože se několik karyotypů shodovalo s nálezy FISH a arrayCGH, většina karyotypů byla neinformativních (například „komplexní“ karyotyp 48~49,XY,?+19,?+20,1-2 mar[cp4]/46,XY[2]; FISH pouze delece 13q14 v 81 % jader; arrayCGH pouze ztráta 13q13.1q14.2), a proto doporučují při vyšetření kombinovat metody FISH a arrayCGH.

Zatímco molekulárně cytogenetické prognostické faktory zjištěné metodou FISH jsou stále potvrzovány a pevně zakotveny ve WHO klasifikaci, o významu změn karyotypu ze stimulovaných kultivací nevíme prakticky nic. Stejně, jako nález bialeické delece 13q14.3 a trisomie chromosomu 12 (3 změny) z CLL FISH panelu nelze interpretovat jako komplexní karyotyp, je chybné spojovat nálezy ze stimulované kultivace s prognostickým významem bez analýz přežívání. V neposlední řadě je možné, že stimulované karyotypy reflektují spíše genetickou nestabilitu buněk v kultuře než skutečný karyotyp nestimulovaných buněk. Z těchto důvodů naše laboratoř tyto metody *ex vivo* stimulace v rutinní diagnostice zatím neužívá.

Závěr kapitoly 5.1.:

V hodnoceném souboru bylo celkové přežití shodně s literaturou ovlivněno negativně delecí *ATM* a *TP53*, a naopak příznivě delecí oblasti 13q14. Prokázali jsme, že zatímco delece *IgVH* je průvodní jevem monoklonality a nemá vliv na pacientovu prognózu, translokace *IgH* genu zásadně závisí na druhém translokačním genu. *Per exclusionem* nejčastějšího partnerského genu *CCND1*, jež svědčí o MCL, diagnostického *MYC* genu (varianty BL) a ojedinělého *BCL2* genu, lze říci, že translokace genu *IgH* se u CLL vyskytují vzácně, stejně jako netypické nálezy CLL FISH panelu.

Při srovnání výsledků nestimulované klasické cytogenetiky a FISH nálezů vyplývá podstatně vyšší pravděpodobnost záchytu chromosomální aberací metodou FISH s relevantní vypovídající hodnotou, neboť nález komplexního karyotypu byl určen vždy v high-risk FISH kategorii, navíc u všech pacientů (kromě jednoho) s delecí genu *TP53*.

Klasická cytogenetika umožňuje na druhou stranu zachytit komplexní aberace, ale karyotypy získané stimulovanou kultivací hodnotíme jako experimentální, s (prozatím) nepotvrzeným významem pro přežití pacienta.

5.2. Klonální vývoj u CLL/SLL

5.2.1. Komentář k práci Berková A., *et al.* 2009 (Příloha č. 3)

V roce 2009 jsme publikovali práci, v níž jsme shrnuli výsledky u 97 nemocných s CLL. Cílem této retrospektivní studie bylo určit statistický význam a závislost mezi klonálním vývojem (získání nové chromosomové aberace v průběhu onemocnění) a dalšími prognostickými parametry - mutačním stavem *IgVH* genů, exprese ZAP-70 a CD38.

Ve studii bylo zahrnuto 97 nemocných s CLL, u kterých byla FISH analýza chromosomových aberací provedena opakovaně dva a vícekrát, s minimálním časovým odstupem 5 měsíců, což byl nejkratší interval detekce nové aberace. U 63 nemocných (65 %) byly chromosomové aberace nalezeny při prvním vyšetření. Klonální vývoj (KV) byl prokázán u 25 nemocných (26 %), nejčastější nově detekovaná aberace byla delece 13q (monoalelická i bialelická, celkem 16 nemocných). Neprokázali jsme statisticky významnou závislost mezi souhrnným klonálním vývojem a jednotlivými prognostickými parametry s výjimkou těch nemocných, u nichž byly detekovány všechny tři sledované faktory spojené s negativní prognózou. U nemocných s mutovaným stavem *IgVH* genů jsme v klonálním vývoji (kromě jednoho nemocného) vždy prokázali přítomnost aberace s příznivou prognózou (monoalelická/bialelická delece 13q).

Soubor nemocných rozdělených podle KV s p hodnotami z této publikace je v **tabulce 4**:

	Total (n=97)	With CE (n=25)	Without CE (n=72)	P-value
Median age at dg in years (range)	58 (35-81)	56 (35-75)	59 (35-81)	
Male; n (%)	54 (55.7)	11 (44.0)	43 (59.7)	
Rai stage at dg; n (%)				
0	45 (46.4)	11 (44.0)	34 (47.2)	
I	30 (30.9)	9 (36.0)	21 (29.2)	
II	15 (15.5)	3 (12.0)	12 (16.7)	
III	3 (3.1)	2 (8.0)	1 (1.4)	
IV	4 (4.1)	0 (0.0)	4 (5.6)	
Prior therapy; n (%)	15 (15.5)	7 (28.0)	8 (11.1)	
Unmutated <i>IgVH</i> ; n (%)	53 (54.6)	17 (68.0)	36 (50.0)	p=0.162
ZAP-70 positive; n (%)	48 (49.5)	16 (64.0)	32 (44.4)	p=0.108
CD38 positive; n (%)	45 (46.4)	15 (60.0)	30 (41.7)	p=0.162
Died; n (%)	19 (19.6)	6 (24.0)	13 (18.1)	p=0.563
Unmutated <i>IgVH</i> + ZAP-70 positive + CD38 positive; n (%)	30 (30.9)	14 (56.0)	16 (22.2)	p=0.005

U 8 nemocných byla od původní, prognosticky příznivé aberace, nalezena v průběhu onemocnění další aberace spojená s vyšším rizikem (11q/17q delece) dle Döhnerova hierarchického systému. Výsledky statistické analýzy vztahu k jednotlivým prognostickým faktorům těchto 8 pacientů je v **tabulce 5**:

	Total	With shift	Other finding	P-value
Unmutated IgVH; n (%)	53/97 (54.6)	7/8 (87.5)	1/8 (12.5)	p=0.051
ZAP-70 positive; n (%)	48/97 (49.5)	6/8 (75.0)	2/8 (25.0)	p=0.132
CD38 positive; n (%)	45/97 (46.4)	7/8 (87.5)	1/8 (12.5)	p=0.015
Unmutated IgVH + ZAP-70 positive + CD38 positive; n (%)	30/97 (30.9)	6/8 (75.0)	2/8 (25.0)	p=0.010

With shift – s posunem v hierarchické klasifikaci do kategorie s vyšším rizikem

V dalším postupu jsme se rozhodli rozšířit soubor a podle zisku dané aberace hodnotit každou kategorii KV zvlášť.

5.2.2. Doplnění souboru klonálního vývoje u CLL (dosud nepublikováno)

V dalším období jsme zařadili do souboru dalších 195 nemocných a provedli analýzu celkem 292 nemocných z 12 českých hematologických klinik nebo ambulancí. Jednalo se o pacienty s opakovanými dvěma a více CLL FISH analýzami, s odstupem minimálně 5 měsíců, 184 mužů (63 %) a 108 žen (37 %). Medián věku při diagnóze byl 61 let (35-89), nicméně přesné datum diagnózy, dobu a typ terapie jsme znali pouze u 242 nemocných, kteří byli zahrnuti do analýz celkového přežívání.

Medián doby od diagnózy do první FISH analýzy byl 34 (0-263) měsíců. Medián doby od první do poslední FISH (DOBA CG SLEDOVÁNÍ) byl 55 (8–182) měsíců. Před prvním odběrem podstoupilo 45 pacientů radioterapii a/nebo chemoterapii a/nebo léčbu kortikoidy, v 7 případech pro karcinom. V průběhu sledování zemřelo 77 nemocných (26%). U 79 pacientů (27 %) jsme zaznamenali klonální vývoj – KV, medián doby do KV byl 35 měsíců, s rozmezím 5-141 měsíců.

Data sledovaných klinických a prognostických faktorů byla známa u Rai stadia při diagnóze v 225, u mutačního stavu *IgVH* genu v 259, CD38 exprese v 252 a ZAP-70 v 224 případech.

Kombinace sledovaných nálezů z CLL FISH panelu – monoalelická a bialelická delece 13q14, trisomie 12, delece *ATM* a delece *TP53* - byla zaznamenávána podle hierarchického modelu (s rozdělením na mono- a bialelickou delecí 13q14) způsobem:

0 – žádná aberace,

M13 – pouze monoalelická delece 13q14.3,

B13 – bialelická delece 13q14.3 (bez jiného nálezu),

12 – trisomie 12 bez ohledu na stav 13q,

11 – delece *ATM* bez ohledu na aberace chromosomu 12 a 13, a

17 – delece *TP53* bez ohledu na ostatní nálezy.

Tímto způsobem byl zapsán nález u první CLL FISH analýzy (VSTUPNÍ FISH) a při změně - při KV – nález poslední analýzy (POSLEDNÍ FISH).

Pro statistickou analýzu jsme nově zavedli pojem FISH STABILNÍ PŘEŽITÍ (FSS), který vystihuje - i u pacientů bez znalosti FISH stavu při diagnóze – dynamiku CLL klonu (tj. KV). FSS jsme tedy definovali jako 1) celkové přežití podle vstupní FISH, pokud nedošlo ke KV, přičemž bod 0 na časové ose bylo datum vstupní FISH a konec určovalo

buď datum ukončení sledování, nebo datum úmrtí, 2) při KV byla časovým bodem 0 poslední zachycená změna, konec byl definován stejně jako v bodu 1.

KV jsme hodnotili jak souhrnně, tak odděleně pro jednotlivé aberace (bez rozlišení mono- a bialelické delecce 13q14.3). Pro zhodnocení vlivu chemoterapie na selekci preexistujících, obtížně detekovatelných klonů s *TP53* delecí, jsme testovali také vliv terapie.

Procentuální zastoupení jednotlivých kvalitativních parametrů v definovaných kategoriích ukazuje **tabulka 6**.

Tabulka 6. Procentuální zastoupení sledovaných parametrů u 292 pacientů.

Parametr	Skupiny	Počet pacientů	%
pohlaví	muži	184	63,0
	ženy	108	37,0
Rai při dg.	chybí	67	22,9
	0	83	28,4
	I	81	27,7
	II	37	12,7
	III	10	3,4
CD38 pozitivní	IV	14	4,8
	chybí	40	13,7
	ne	135	46,2
	ano	117	40,1
ZAP-70 pozitivní	chybí	68	23,3
	ne	105	36,0
	ano	119	40,8
mutovaný <i>IgVH</i>	chybí	33	11,3
	ne	147	50,3
	ano	112	38,4
terapie	chybí	50	17,1
	ne	127	43,5
	ano	115	39,4
vstupní FISH	0	99	33,9
	B13	22	7,5
	M13	66	22,6
	12	30	10,3
	11	58	19,9
	17	17	5,8
KV celkem	ne	213	73,0
	ano	79	27,0

- získ 13q14.3 delece	ne	254	87,0
	ano	38	13,0
- získ trisomie 12	ne	290	99,3
	ano	2	0,7
- získ <i>ATM</i> delece	ne	269	92,1
	ano	23	7,9
- získ <i>TP53</i> delece	ne	276	94,5
	ano	16	5,5
poslední FISH	0	61	20,9
	M13	61	20,9
	B13	33	11,3
	12	30	10,3
	11	74	25,3
	17	33	11,3
žije	ne	77	26,3
	ano	215	73,7

Hierarchický zápis vstupní a poslední FISHV: 0 – žádná aberace, M13 – pouze monoalelická delece 13q14, B13 – bialelická delece 13q14 bez ohledu na nález monoalelické (bez jiného nálezu), 12 – trisomie 12 bez ohledu na stav 13q (bez nálezu *ATM* nebo *TP53* delece), 11 – delece *ATM* (bez delece *TP53*) bez ohledu na chromosom 12 a 13, 17 – delece *TP53* bez ohledu na ostatní nálezy.

5.2.2.1. Analýza celkového přežití

Tabulka 7. Souhrn statistického významu jednotlivých parametrů z hlediska OS (n=242)

Parametr	Skupiny	Počet pacientů	Počet úmrtí	Medián přežívání (měsíce)	p=
pohlaví	muži	156	50	140	0,016
	ženy	86	19	184	
Rai při dg.	0	83	15	198	0,001
	I	81	22	222	
	II	37	16	92	
	III	10	5	71	
	IV	14	6	124	
vstupní FISH	0	83	20	184	0,001
	11	44	21	90	
	12	25	6	153	
	B13	18	3	nedosažen	
	M13	58	13	nedosažen	
	17	14	6	101	
KV celkem	ne	170	45	150	0,848
	ano	72	24	153	
zisk 13q14.3 delece	ne	205	58	161	0,427
	ano	37	11	143	
zisk trisomie 12	ne	240	68	153	0,403
	ano	2	1	59	
zisk ATM delece	ne	225	64	150	0,406
	ano	17	5	198	
zisk TP53 delece	ne	226	62	153	0,256
	ano	16	7	124	
CD38 pozitivní	ne	129	23	222	0,001
	ano	109	45	124	
ZAP-70 pozitivní	ne	102	20	184	0,013
	ano	108	36	133	
mutovaný <i>IgVH</i>	ne	126	47	104	0,001
	ano	102	16	222	
terapie	ne	127	19	282	0,001
	ano	115	50	124	

Shrnutí z tabulky 7, OS statisticky významně nepříznivě ovlivňuje mužské pohlaví, pokročilejší Rai stadium při diagnóze, high-risk aberace ve vstupní FISH, CD38 i ZAP-70 pozitivita, nemutovaný mutační stav *IgVH* a terapie.

Nutno také zmínit souvislosti v těchto univariantních analýzách: muži mají častěji nemutované *IgVH* (Catovsky D. *et al.*, 2014), pacienti v pokročilejších Rai stadiích při

diagnóze výrazně častěji splňují kritéria pro zahájení léčby a častěji mají nejvýznamnější nepříznivé prognostické faktory, tedy nemutované *IgVH* a high-risk FISH aberace, obzvláště delecí genu *TP53* na 17p13.1. Z dalšího pohledu je pak terapie indikována častěji u pacientů s rizikovými faktory.

5.2.2.2. Predispozice ke klonálnímu vývoji

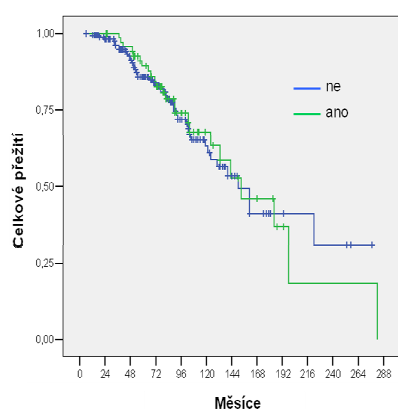
Predispozici ke KV jsme zjišťovali podle původního FISH nálezu. Po rozdělení pacientů na dvě skupiny podle KV (KV ano a KV ne), jsme porovnávali dobu jejich celkového přežívání (OS).

Jak vyplývá z **tabulky 7**, žádná taková predispozice v našem souboru, a to jak souhrnného KV, tak i zisku jednotlivých aberací v rámci KV, neexistovala.

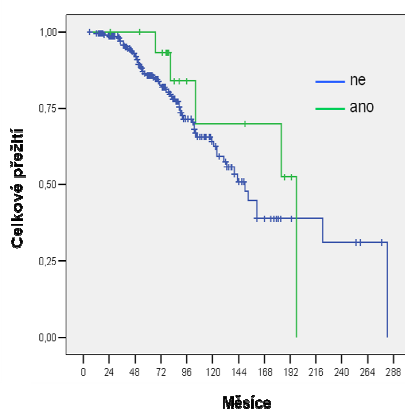
Na **obrázku 9** jsou vidět výsledky přežití podle (budoucího) klonálního vývoje:

a) všech kategorií KV ($p=0,848$), b) zisku delece *ATM* v KV ($p=0,406$), c) zisku delece *TP53* v KV ($p=0,256$).

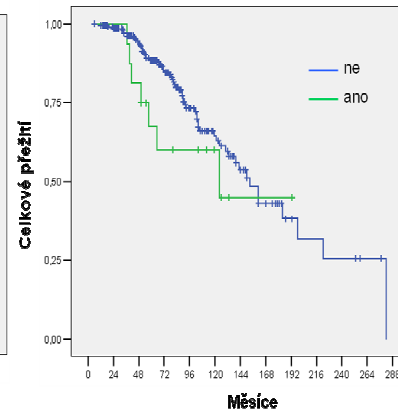
9a) všechny typy KV



9b) KV *ATM*



9c) KV *TP53*



5.2.2.3. Závislost KV na sledovaných parametrech

Pro hodnocení závislosti KV na sledovaných parametrech jsme vycházeli z nálezů vstupního CLL FISH panelu, dostupných dat jednotlivých rizikových faktorů a údajů o terapii.

Testovali jsme vztah jednotlivých aberací v rámci KV k době CG sledování, CD38 pozitivitě, ZAP-70 pozitivitě, nemutovaným *IgVH* a předchozí terapii.

Zisk delece 13q14.3

Deleci 13q14.3 získalo 38 pacientů.

Ze všech proměnných závisel zisk delece 13q14.3 pouze na době CG sledování – byla statisticky významně delší u pacientů s KV 13q14.3 (69 versus 58 měsíců), **p=0,042**. Souvislost s ostatními parametry nebyla prokázána.

Zisk trisomie 12

K této události došlo v našem souboru pouze dvakrát. Vztahy ke sledovaným parametrům jsou nehodnotitelné pro chybu malých čísel.

Zisk ATM delece

K zisku delece genu *ATM* došlo u 23 nemocných.

Doba CG sledování byla u pacientů s KV *ATM* statisticky významně delší než u pacientů bez KV (79 versus 57 měsíců), **p=0,004**. Závislost na dalších kvalitativních parametrech nebyla prokázána (**tabulka 8**).

Tabulka 8. Závislost KV *ATM* na sledovaných parametrech.

Parametr	stav	Zisk <i>ATM</i> delece				p=
		ne		ano		
		n	%	n	%	
CD38 pozitivní	ne	127	94,1	8	5,9	0,577
	ano	108	92,3	9	7,7	
ZAP-70 pozitivní	ne	98	93,3	7	6,7	0,987
	ano	111	93,3	8	6,7	
Mutovaný <i>IgVH</i>	ne	139	94,6	8	5,4	0,404
	ano	103	92,0	9	8,0	
Terapie	ne	119	93,7	8	6,3	0,643
	ano	106	92,2	9	7,8	

Zisk delece TP53

K zisku delece genu TP53 došlo v hodnoceném souboru u 16 pacientů.

KV TP53 nezávisí na jediném parametru, a to na době CG sledování.

Statisticky významně však závisí na všech negativních prognostických faktorech včetně toho nejzásadnějšího – nemutovaných *IgVH*, a také na předchozí chemoterapii (**tabulka 9**).

Tabulka 9. Závislost KV TP53 na sledovaných parametrech.

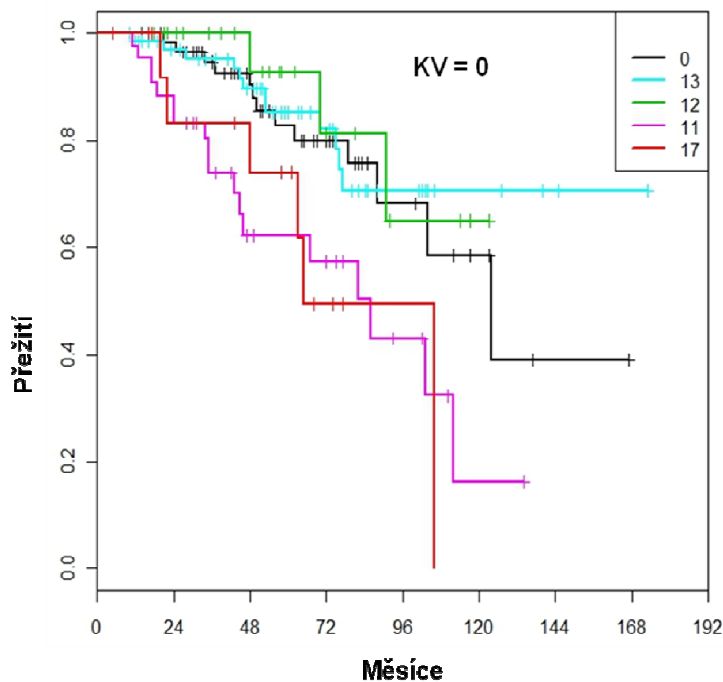
Parametr	stav	Zisk delece TP53				χ^2	p=
		ne		ano			
		n	%	n	%		
CD38 pozitivní	ne	131	97,0	4	3,0	5,607	0,018
	ano	105	89,7	12	10,3		
ZAP-70 pozitivní	ne	102	97,1	3	2,9	4,663	0,031
	ano	107	89,9	12	10,1		
Mutovaný <i>IgVH</i>	ne	134	91,2	13	8,8	5,804	0,016
	ano	110	98,2	2	1,8		
Terapie	ne	125	98,4	2	1,6	10,981	0,001
	ano	101	87,8	14	12,2		

5.2.2.4. Vliv KV na celkové přežití

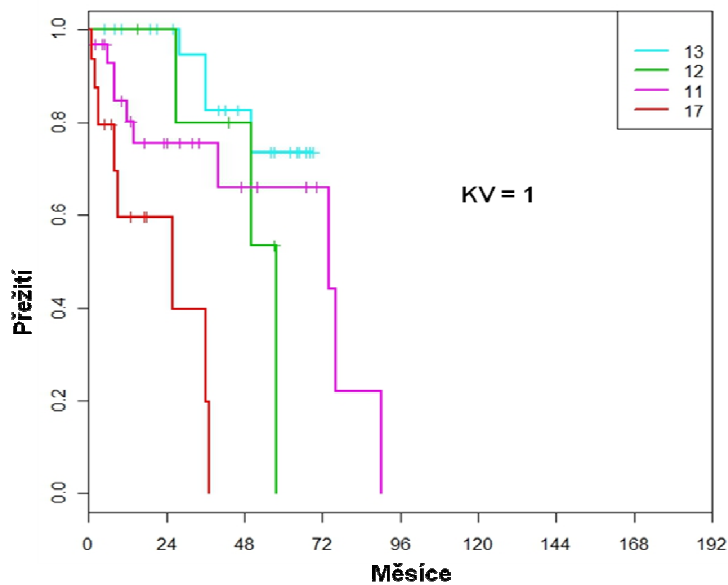
Pro tyto analýzy jsme zaznamenávali změnu FISH nálezu na časové ose průběhu choroby, což vystihuje doba FISH stabilního přežití (FSS), jak jsme definovali výše. Po rozdělení na podsoubor KV ano a KV ne jsme p hodnotu získali Mantle-Coxovým testem rovností funkcí přežívání u jednotlivých kombinací FISH změn, rozdělených podle hierarchického modelu, avšak bez rozdělení na monoalelickou a bialelickou 13q14.3 delecí, neboť mezi těmito skupinami nebyl podle FSS prokázán statisticky významný rozdíl ($p=0,693$), a mohly tak být v analýzách sloučeny do jedné kategorie - 13. Porovnávali jsme tedy dobu přežívání například u FISH kategorie 17 podle přítomnosti delece *TP53* ve vstupní FISH oproti zisku delece *TP53* v průběhu sledování v rámci KV, u kategorie 11 podle delece *ATM* v první FISH nebo v následující, analogicky i u kategorie 12 a 13.

Výsledné Kaplan-Meierovy křivky souhrnně pro všechny kategorie v podsouboru bez KV a s KV jsou na **obrázku 10 a 11**.

Obrázek 10. Analýza přežívání v podsouboru **bez KV**.



Obrázek 11. Analýza přežívání v podsouboru s **KV**.

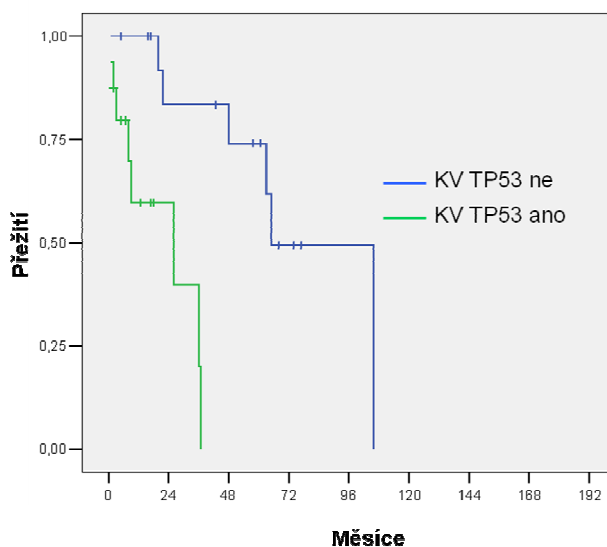


U kategorie 13 ($p=0,319$) a 11 ($p=0,155$) nebyl podle doby detekce aberace (ve vstupní versus následné FISH) prokázán statisticky významný rozdíl v přežívání.

V případě kategorie 12 byla hodnota $p=0,002$, ale vzhledem k malému počtu považujeme výsledek za bias.

Statisticky významný rozdíl v přežívání podle FSS byl však prokázán u kategorie 17 – pacienti s detekovanou delecí *TP53* ve vstupní FISH ($n=17$, medián přežití 65 měsíců) žili déle než ti, co delecí *TP53* získali v průběhu nemoci ($n=16$, medián přežití 26 měsíců), jak ukazuje **obrázek 12**.

Obrázek 12. Vliv KV *TP53* na přežívání ($p=0,001$).



5.2.2.5. Multivariantní analýza - hodnocení vlivu sledovaných faktorů na FISH-stabilní přežití, Coxův regresní model

Do vícerozměrného modelu byly zahrnuty CD38 pozitivita, ZAP-70 pozitivita, mutované *IgVH*, terapie, dále klonální vývoj KV (všechny typy) a hierarchicky zaznamenaný nález FISH podle KV (tedy u pacientů bez KV stejný jako nález vstupní FISH, u pacientů s KV záznam poslední změny).

Pro relevantní zhodnocení přežití s ohledem na změnu FISH nálezu jsme sledovali vliv těchto faktorů na FISH-stabilní přežití (FSS), tedy u pacientů bez KV počet měsíců od první FISH do ukončení sledování nebo data úmrtí, u pacientů s KV pak počet měsíců od poslední změny FISH nálezu do ukončení sledování nebo data úmrtí.

Jako významné negativní prediktory délky FSS byly v prvním vícerozměrném modelu identifikovány KV, nemutované *IgVH*, terapie a delece genu *TP53* (17p13.1) ve FISH podle KV. CD38 a ZAP-70 pozitivita nebyla statisticky významná. Následně byl vytvořen výsledný model uvedený v **tabulce 10**.

Tabulka 10. Vliv různých faktorů na FSS pomocí vícerozměrného Coxova regresního modelu (n = 228 pacientů; počet úmrtí 63).

Proměnná	Riziková/ Referenční kategorie	HR	95% IS	p-hodnota
KV	ano/ne	2,76	1,54-4,95	< 0,001
Nemutované <i>IgVH</i>	ano/ne	2,04	1,08—3,85	0,029
Terapie	ano/ne	2,51	1,31-4,83	0,006
FISH podle KV	13/0	1,25	0,54-2,89	0,610
	12/0	1,95	0,66-5,74	0,223
	11/0	1,71	0,73-3,98	0,216
	17/0	5,13	2,02-13,02	< 0,001

Diskuse:

Cytogenetický vývoj klonu CLL buněk v průběhu choroby je poměrně častý, na tom se shodují všechny dřívější i aktuální práce na toto téma. Ovšem odpovědět na základní otázky, zda dochází ke KV častěji u pacientů z určitých rizikových skupin a jaký má KV význam pro celkové přežití, se zatím použitými metodami nepodařilo jednoznačně objasnit. Proto jsme zvolili v obou bodech odlišný přístup: vliv jednotlivých parametrů jsme hodnotili pro každou ze 4 kategorií KV zvlášť, tedy zisk delece 13q14.1 v rámci KV (KV 13q14.1), zisk trisomie 12 (KV 12), zisk delece genu *ATM* v oblasti 11q22.3 (KV *ATM*) a zisk delece genu *TP53* v oblasti 17p13.1 (KV *TP53*). Za druhé, pro sledování vlivu získané změny na délku přežití jsme zavedli pojem FISH-stable survival (FSS) s ohledem na jednotlivé aberace, jejichž kombinaci jsme zaznamenávali podle hierarchického systému (například 110013 je delece *ATM* s delecí 13q14.3 bez trisomie 12 a bez delece *TP53*; 17000000 je delece *TP53* bez další změny v CLL FISH panelu).

Zastoupení čtyř nejčastějších aberací podle vstupní FISH v hodnoceném souboru odpovídalo obvyklým frekvencím publikovaným v literatuře (Döhner H. *et al.*, 2000; Šindelářová L. *et al.*, 2005). Deleci 13q14 jsme detekovali u 55,5 % nemocných (z toho bialelickou delecí u 11,3 %), trisomii 12 u 12,3 %, delecí 11q22 u 20,2 % a delecí 17p13 jsme našli u 5,8 % pacientů. Podle hierarchického rozdělení pak bylo v kategorii 0 (žádné zjištěné aberace) 33,9 % nemocných, v kategorii 13 (pouze delece 13q14 bez jiného nálezu) 30,1 %, v kategorii 12 (trisomie 12 bez ohledu na stav 13q, ale bez delece 11q a 17p) 10,3 %, v kategorii 11 (delece 11q22.3 bez ohledu na nález 12 a 13q, ale bez delece 17p) 19,9 % a v kategorii 17 (delece 17p13.1 bez ohledu na ostatní nálezy) 5,8 % pacientů. Ke klonálnímu vývoji došlo u 79 nemocných (27 %), a tím se změnilo zastoupení v jednotlivých kategoriích na konci sledování na 0 – 20,9 %, 13 – 32,2 %, 11 – 25,3 %, 17 – 11,3 % nemocných, zatímco v kategorii 12 zůstalo 30 pacientů - 10,3 % (2 se ziskem trisomie 12 byli vstupně ve skupině 0, zatímco 2 vstupně v kategorii 12 získali delecí genu *ATM* a tedy na konci sledování byli v kategorii 11).

V hodnoceném souboru jsme pozorovali prodloužení doby OS podle jednotlivých aberací oproti původní práci Döhner H. *et al.* (2000). Překvapivý je v našem souboru medián přežívání u pacientů s delecí *TP53* ve vstupní FISH (101 měsíců, do hodnocení OS však bylo zahrnuto 14 ze 17 nemocných, u kterých jsme znali potřebná data). Nicméně vliv na OS v závislosti na fázi onemocnění, v jaké je delece *TP53* detekována, studovali vědci

z Mayo Clinic z americké Minnessoty na souboru 159 pacientů s CLL a zjistili, že medián OS nemocných s delecí *TP53* zjištěnou do jednoho roku od diagnózy (de novo 17p-) je 56 měsíců, zatímco medián OS pacientů se získanou delecí v průběhu choroby je méně než 16 měsíců (Shanafelt T.D. *et al.*, 2006; Shanafelt T.D. *et al.*, 2008). Další studie této skupiny ve spolupráci s M.D. Anderson Cancer v Houstonu (Tam C.S. *et al.*, 2009) porovnávala klinický průběh u 99 pacientů s CLL a de novo 17p-. Pokud tito pacienti nedospěli k potřebě léčby do 18 měsíců, pak u nich probíhala nemoc po dlouhou dobu indolentně. Jako statisticky významné rizikové faktory pro progredující průběh CLL (tedy potřebu terapie) určili Rai stadium \geq I, nemutované *IgVH* a delecí *TP53* ve více než 25 % interfázních jader, se závěrem, že i CLL s delecí 17p13.1 vykazuje klinickou heterogenitu. V souladu s citovanými publikacemi jsme potvrdili statisticky významný negativní vliv zisku delece *TP53* v průběhu nemoci na přežití, ještě významnější než její přítomnost v době diagnózy.

Pouze metodou FISH hodnotilo četnost a význam vývoje klonu několik studií. Shanafelt T.D. *et al.* (2006) zjistili KV u 18/108 nemocných (17 %), popsali zvyšující se výskyt KV u pacientů sledovaných déle než 5 let a ZAP-70 pozitivních (KV u 13/31 ZAP-70 pozitivních versus u 3/29 ZAP-70 negativních), asociaci s CD38 pozitivitou a s nemutovanými *IgVH* geny neprokázali, zatímco Stilgenbauer S. *et al.* (2007) prokázali KV pouze u pacientů s nemutovaným *IgVH* (CD38 a ZAP-70 nesledován), a určili vývoj klonu nezávislým nepříznivým prognostickým faktorem (četnost KV 11/64 pacientů, 17 %). V práci Loscertales J. *et al.* (2010) byl KV zaznamenán u 17 z 81 pacientů (21 %), 9x šlo o nově detekovanou delecí *TP53* a 4x o delecí *ATM*, nicméně u KV obecně (všechny kategorie hodnoceny dohromady) nebyla prokázána souvislost s mutačním stavem *IgVH* jako jediným sledovaným parametrem. Vliv KV na OS nebyl hodnocen. Ve studii Janssens A. *et al.* (2012) se zaměřili pouze na zisk high-risk aberací v KV, ke kterému došlo u 11 z 95 sledovaných pacientů (12 %; u 7 delece *TP53* a u 4 delece *ATM*). Relativní riziko zisku high-risk aberace nebylo ovlivněno CD38 a ZAP-70 pozitivitou, nemutovaným stavem *IgVH*, zdvojovacím časem lymfocytů (LDT), původním FISH nálezem ani předchozí terapií, zatímco v multivariantní analýze celkového přežití byl zisk high-risk aberace určen jako nejsilnější nezávislý prognostický faktor s hodnotou $p=0,01$ (pro srovnání: pro nemutované *IgVH* byla hodnota $p=0,024$). Nicméně pro Coxovu regresní analýzu použili výsledek poslední FISH u všech 95 pacientů (s KV i bez KV).

Do hodnocení KV u CLL další skupiny zahrnuli kromě výsledků CLL FISH panelu i výsledky klasické cytogenetické analýzy, získané stimulovanou kultivací. Lopez C. *et al.* (2013) určili v karyotypu (po kultivaci s přidavkem TPA na 72 hodin) KV u 12 z 84 případů, metodou FISH pak u 40 ze 129. Do statistických analýz pak zahrnuli všechny typy KV určené jak změnou karyotypu tak FISH (KV u 47 ze 143, 33 %). Jako nevýznamné ve vztahu ke KV určili všechny prognostické faktory (ZAP-70, CD38 a stav *IgVH*), v multivariantní analýze pak zjistili u KV kratší dobu do léčby (TFS), avšak dobu TFS i OS určili od data diagnózy u pacientů s KV i bez KV. Tím nezohlednili změnu cytogenetického / FISH nálezu. Obě metody použili k hodnocení KV také Brejcha M. *et al.* (2014), přičemž buňky v kultivaci stimulovali přidavkem CpG a IL-2 na 5-24 hodin. Zjistili KV ve 48/140 případech (34 %), přičemž posun do high-risk kategorie (definovaný jako nový nález delece *ATM* / delece *TP53* / komplexního karyotypu = 3 a více změn) u 21 pacientů (15 %). Neprokázali souvislost high-risk KV s žádným ze tří sledovaných rizikových faktorů (CD38+, ZAP-70+ a nemutované *IgVH*), zaznamenali však statisticky významnou korelaci high-risk KV s předchozí léčbou. Vliv KV na OS nebyl hodnocen. Cílem polské práce Wawrzyniak E. *et al.* (2013) bylo porovnat četnost a typ KV metodou FISH a klasickou cytogenetikou (kultivace pouze s CpG oligonukleotidy 72 hodin) u 38 opakovaně vyšetřených pacientů. V karyotypu zaznamenali KV v 15 případech (z těchto high-risk KV v 6), metodou FISH v 10 (high-risk KV u 5). V univariantní analýze nebyl zjištěn vliv KV na celkové přežívání (OS), avšak dobu OS určili od diagnózy nebo od první FISH analýzy.

Z těchto výsledků je zřejmé, že pro relevantní hodnocení souvislosti KV s rizikovými faktory i pro určení významu KV pro přežívání je potřeba analyzovat jednotlivé aberace získané v průběhu nemoci zvlášť. Tímto postupem jsme v hodnoceném souboru mohli testovat význam pro přežití i závislost konkrétních typů KV na sledovaných parametrech. Zjistili jsme, že KV *ATM* signifikantně souvisí pouze s dobou sledování ve smyslu čím déle má pacient CLL, tím pravděpodobněji u něj dojde k zisku delece *ATM* ($p=0,004$). Objevení se delece *ATM* však nemá vliv na celkové přežívání ($p=0,155$). V případě KV 13q14.1 byla situace obdobná, ale s dobou sledování souvisí pouze na hranici statistické významnosti ($p=0,042$), proto bude nutné tento závěr ověřit na větším souboru nemocných. Ke KV 12 došlo pouze ve dvou případech, tím považujeme výsledky za neinterpretovatelné kvůli chybě malých čísel, avšak oproti jiným typům KV hodnotíme jako velmi vzácnou událost. KV *TP53* významně závisela na všech sledovaných parametrech, kromě doby sledování - jak na všech negativních prognostických faktorech,

tak i na předchozí terapii. Při uvažované nepřítomnosti predispozice ke KV *TP53* v době diagnózy (nebo první FISH analýzy), se detekce delece *TP53* v průběhu nemoci jeví jako víceméně multifaktoriální událost (ostatně stejně jako každý typ KV). Z našich výsledků vyplývá, že svou roli v různé míře hraje nepříznivá biologická povaha choroby, ať z již ověřených negativních prognostických faktorů nebo těch slibných - mutace genu *BIRC3*, *NOTCH1* a *SF3B1* (Rossi D. *et al.*, 2013), stejně jako těch dosud neznámých. Příkladem je jediný pacient z 16 s KV *TP53* bez předchozí terapie a s nemutovanými *IgVH* geny. Dalším faktorem je předchozí terapie, na které statisticky závisí KV *TP53*, bez ohledu na počet cyklů. V tomto ohledu má jistě úlohu selekce minoritního rezistentního klonu s delecí *TP53* (Malčíková J. *et al.*, 2010; Rossi D. *et al.*, 2014), stejně jako i neznámá individuální farmakogenetická odolnost – příkladem je KV *TP53* u pacientky léčené pouze jedním cyklem FCR (léčba přerušena kvůli alergické reakci). Významný negativní efekt zisku delece *TP53* na přežívání (FSS) jsme zjistili jak v jednorozměrné analýze ($p=0,001$), tak i v multivariantním Coxově regresním modelu, ve kterém byl prokázán vliv terapie ($p=0,006$), nemutovaného stavu *IgVH* ($p=0,029$) a celkového KV, ovšem při pohledu na **tabulku 10** je evidentní, že z kategorií KV byla významná pouze delece *TP53* ($p=0,001$).

V poslední době hodnocení korelací a významu KV paradoxně zkomplikovalo společné hodnocení KV jak metodou FISH, tak i klasickou analýzou karyotypu pomocí nových kultivačních metod, s převzatou definicí komplexního karyotypu jako nález tří a více aberací a paušální interpretací negativní prognózy. Výpovědní hodnota klasické cytogenetické analýzy při šetrné kultivaci bez mitogenů v porovnání se záchytem aberací CLL FISH panelem je velmi nízká, jak vidno například z nálezů v našem souboru. Na druhou stranu, u všech 11 nálezů komplexních karyotypů v souvislosti s CLL jsme prokázali metodou FISH high-risk aberaci, u 10/11 delecí *TP53*.

Závěr kapitoly 5.2.:

Analýzou souboru 292 pacientů s CLL s opakovanými FISH vyšetřeními jsme prokázali klonální vývoj (KV) - změnu nálezu CLL FISH panelu – v 79 případech (27 %), konkrétně šlo o zisk delece 13q14.3 u 38, delece genu *ATM* u 23, delece genu *TP53* u 16 a zisk trisomie 12 pouze u 2 pacientů (tato kategorie znemožňuje hodnocení kvůli chybě malých čísel). Predispozici k zisku jednotlivých aberací v době diagnózy jsme nezjistili.

Hodnocením každé kategorie KV zvlášť jsme došli k výsledkům závislosti KV na sledovaných parametrech a významu pro celkové přežití. Zisk delece 13q14.3 a *ATM* v rámci KV souvisí pouze s dobou trvání choroby, ve smyslu čím déle pacient žije s CLL, tím má větší pravděpodobnost zisku těchto aberací, avšak na jeho přežití tyto dva typy KV dopad nemají.

U zisku delece genu *TP53* v rámci KV je situace opačná. Tato kategorie KV závisí jak na negativních prognostických faktorech (nemutovaný status *IgVH*, CD38 a ZAP-70 pozitivita), tak na předchozí léčbě a znamená pro pacienta špatnou prognózu. V multivariantní analýze jsme identifikovali tři faktory s negativním vlivem na celkové přežití. Nejsilnější byl vliv zisku delece *TP53* ($p=0,001$, HR 5,13), terapie ($p=0,006$, HR 2,51) a nemutovaného stavu *IgVH* ($p=0,029$, HR 2,04), avšak vliv terapie přímo souvisí s heterogenitou onemocnění – pacienti s indolentní CLL nedospějí roky k potřebě léčby oproti nemocným s rychle progredující chorobou.

Závěrem lze shrnout, že hodnotit prognostický význam všech typů klonálního vývoje dohromady je zavádějící. Prokázali jsme, že delece genu *TP53*, zjištěná v průběhu nemoci, významně negativně ovlivňuje pacientovo celkové přežití. Pro pacienty s CLL je v současnosti nejpřínosnější opakovat molekulárně cytogenetické vyšetření vždy před léčbou a při progresi nemoci pro naplánování nejvhodnějšího cíleného terapeutického přístupu, který je intenzivně u pacientů s touto aberací řešen.

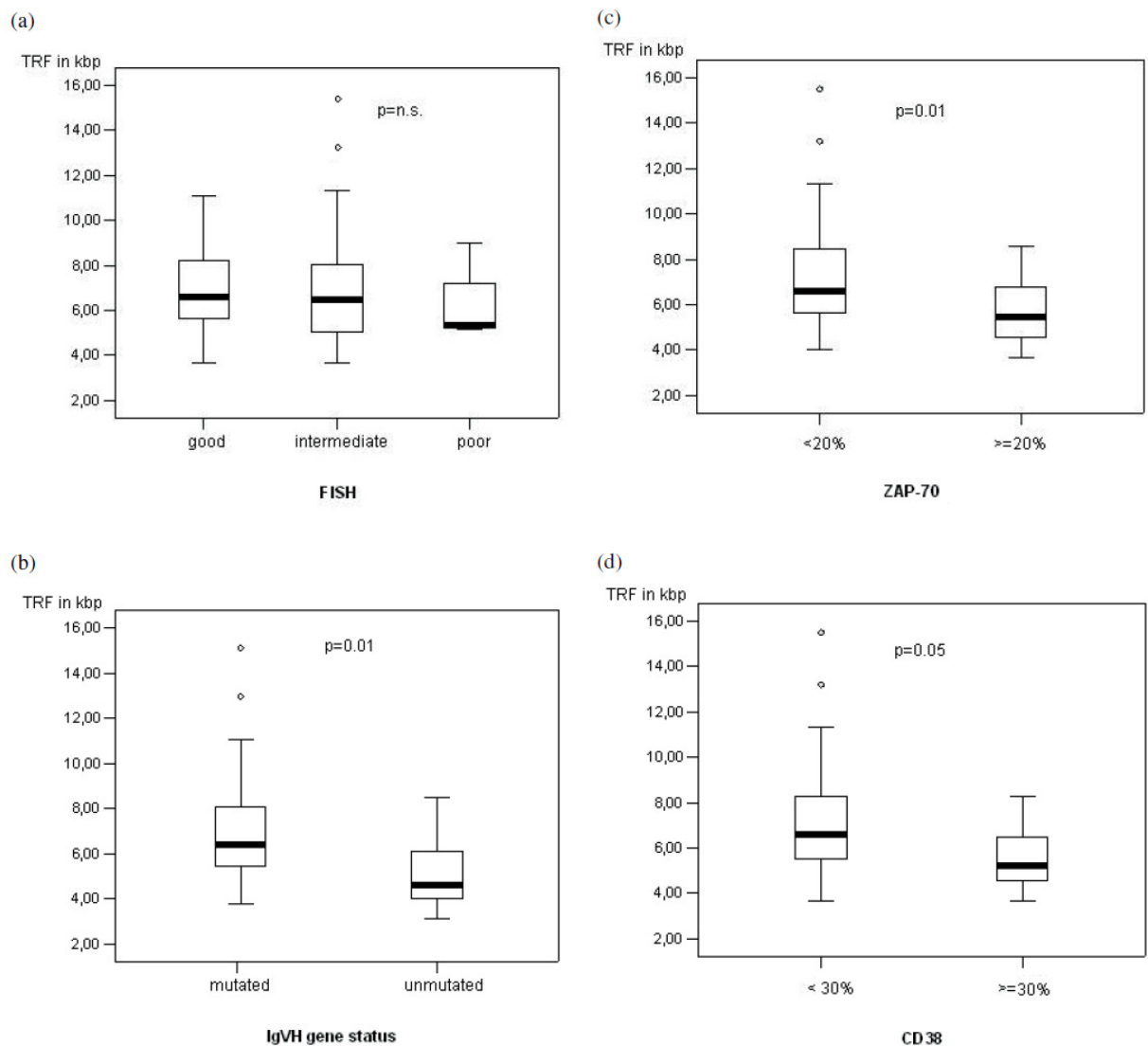
5.3. Význam délky telomér u CLL

V článku publikovaném v roce 2010 (Březinová J. *et al.*, 2010, Příloha č. 4) a v přehledu publikovaném v roce 2010 (Gančarčíková M. *et al.*, 2010, Příloha č. 5) jsme se zabývali vztahem délky telomér a prognostických faktorů u nemocných s CLL.

Komentář k práci Březinová J. *et al.*, 2010

Výše popsanou metodou Terminal Repeat Fragment (TRF) jsme stanovili délku telomér v souboru 66 nemocných s CLL bez předchozí léčby, vyšetřených v letech 2007 – 2008, a vyhodnotili jsme závislost mezi délkou telomér a ostatními prognostickými parametry – chromosomovými aberacemi, telomerázovou aktivitou, mutačním stavem *IgVH* genů, expresí ZAP-70 a CD38. Při stanovení diagnózy bylo vyšetřeno 19 nemocných, v průběhu onemocnění 47 nemocných, statisticky významný rozdíl v délce telomér mezi těmito dvěma skupinami jsme neprokázali ($p=0,116$). Zkrácené teloméry jsme detekovali u pacientů s nemutovaným stavem *IgVH* ($p=0,01$), ZAP-70 pozitivních ($p=0,01$), CD38 pozitivních ($p=0,05$) a rovněž u pacientů s pozitivní telomerázovou aktivitou ($p=0,05$). Chromosomové aberace byly přítomny u 48 nemocných (73 %), nejčastějším nálezem byla delece 13q, nalezená u 42 nemocných (64 %). Pro korelaci délky telomér a chromosomových aberací byl soubor dle cytogenetického nálezu rozdělen do 3 skupin: s dobrou prognózou (delece 13q jako samostatná aberace, včetně bialelické delece 13q), se špatnou prognózou (delece genů *ATM* a *TP53*) a se střední prognózou (ostatní nálezy detekované metodou FISH). Statistický významný rozdíl v délce telomér mezi jednotlivými skupinami nebyl prokázán, a to především z důvodu nízkého počtu nemocných ve skupině s cytogeneticky špatnou prognózou.

Výsledky z této publikace jsou v následujících grafech (obrázek 13):



Diskuse:

U MDS, MM a akutní myeloidní leukémie byla v literatuře popsána souvislost mezi počtem genetických aberací a délkou telomér ve smyslu čím více aberací, tím kratší teloméry (Wu K.D. *et al.*, 2003; Swiggers S.J. *et al.*, 2006; Sieglová Z. *et al.*, 2004). Jen několik studií na toto téma bylo popsáno u CLL. Zatímco Roos G. *et al.* (2008) popsali u 152 nemocných statisticky významnou korelaci krátkých telomér a delece 11q/17p (a naopak dlouhých telomér u delece 13q), jiná práce asociaci krátkých telomér a nepříznivé cytogenetiky neprokázala (Ricca I. *et al.*, 2007). V naší studii jsme nenalezli asociaci délky telomér a cytogenetických aberací, zatímco statisticky významně kratší teloméry byly detekovány u nemocných s negativními prognostickými ukazateli (s nemutovanými *IgVH*, ZAP-70 a CD38 pozitivitou), avšak rozpětí hodnot se překrývají.

Závěr kapitoly 5.3.:

V naší studii jsme významnou souvislost délky telomér s cytogenetickými aberacemi neprokázali. Kratší teloméry byly detekovány u nemocných se známými negativními prognostickými ukazateli (s nemutovanými *IgVH*, ZAP-70 a CD38 pozitivitou), což nepřináší významnou informaci.

Navíc, určení délky telomér je technicky náročné. Existuje několik metodik, které ale nejsou standardizované a tudíž nejsou vhodné pro rutinní praxi.

5.4. Význam cytogenetických analýz u NHL

S touto částí souvisí recentně publikovaná kazuistika Šárová *et al.*, 2014.

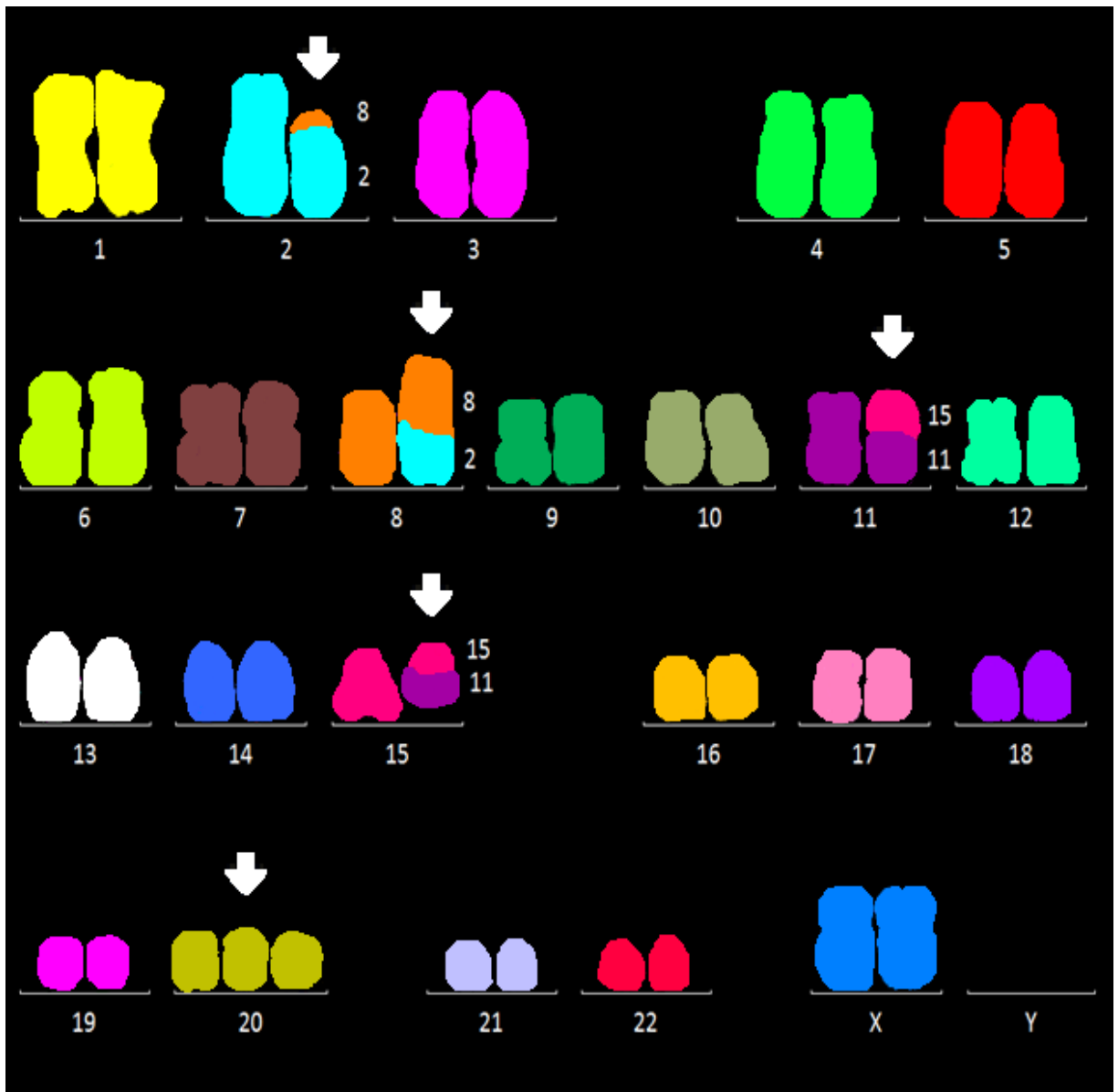
5.4.1. Komentář k práci Šárová I. *et al.*, 2014 (Příloha č. 6)

V publikaci popisujeme komplexní karyotyp nemocného s Burkittovým lymfomem / leukémií (BL) s translokací $t(2;8)(p12;q24)$ (*IgLκ/MYC*), zahrnující dva vzácné cytogenetické jevy – chromotripsis a jumping-like translokaci. Chromotripsis a chromoanasyntesa (rozpad a znovu-seskupení malého úseku chromosomu) je hypotetické vysvětlení vzniku komplexních přestaveb, postihujících jeden nebo více chromosomů, vzniklá na základě jedné katastrofické události (Stephens P.J. *et al.*, 2011; Liu G. *et al.*, 2014). Jumping translokace (JT) jsou nebalancované chromosomové přestavby, při kterých je stejná část donorového chromosomu translokována na dva a více recipientních chromosomů v různých buňkách u stejného nemocného a obvykle vede k duplikaci donorového chromosomového segmentu a částečné delecii recipientního chromosomu (Jamet D. *et al.*, 2005).

V tomto případě zaprvé šlo o chromotripsis chromosomu 15, maskovanou zdánlivě balancovanou reciprokou translokací $t(11;15)(p11.2;q21)$. Druhou změnou je zvláštní typ jumping translokace, a to jumping translokace „naruby“, postihující dlouhé rameno chromosomu 13 (recipient) a množství různých donorových chromosomových segmentů. Vzhledem k přítomnosti translokace $t(11;15)(p11.2;q21)$ ve všech vyšetřovaných mitosách předpokládáme, že chromotripsis vznikla v časném stádiu onemocnění a mohla tak zásadně přispět k leukemické transformaci Burkittova lymfomu. Jumping translokace „naruby“, přítomná pouze v některých vyšetřovaných mitosách, velmi pravděpodobně svědčí o prohlubování progresu nemoci.

Na **obrázku 14.** z této publikace je komplexní karyotyp pacientky, metoda multicolor FISH (mFISH).

47,XX,t(2;8)(p12;q24),t(11;15)(p11.2;q21),+20.



5.4.2. Double hit lymfomy

Zabýváme se rovněž detekcí vysoce agresivních, vzácných double hit lymfomů – podle klasifikace WHO 2008 spadajících do kategorie „Neklasifikovatelný B-lymfom, se znaky mezi DLBCL a Burkittovým lymfomem“ a nesoucích translokací *MYC* genu společně s translokací genu *BCL2* nebo translokací genu *BCL6*. U nemocných s podezřením na double hit lymfom jsme metodou FISH se sondami BCL2 BA, BCL6 BA a MYC BA (Abbott MolecularTM) detekovali přítomnost zlomu (účasti v translokaci) genu *BCL2* (18q21), *BCL6* (3q27) a genu *MYC* (8q24).

Celkem bylo vyšetřeno 33 pacientů s diagnózou difúzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL) nebo lymfomu s rysy DLBCL a Burkittova lymfomu (BL), kteří byli diagnostikováni a případně léčeni v rozmezí let 2010 a 2014 na I. interní klinice VFN a 1.LFUK. V tomto souboru byl double hit lymfom prokázán ve 4 případech. Základní charakteristiky souboru jsou v **tabulce 11**.

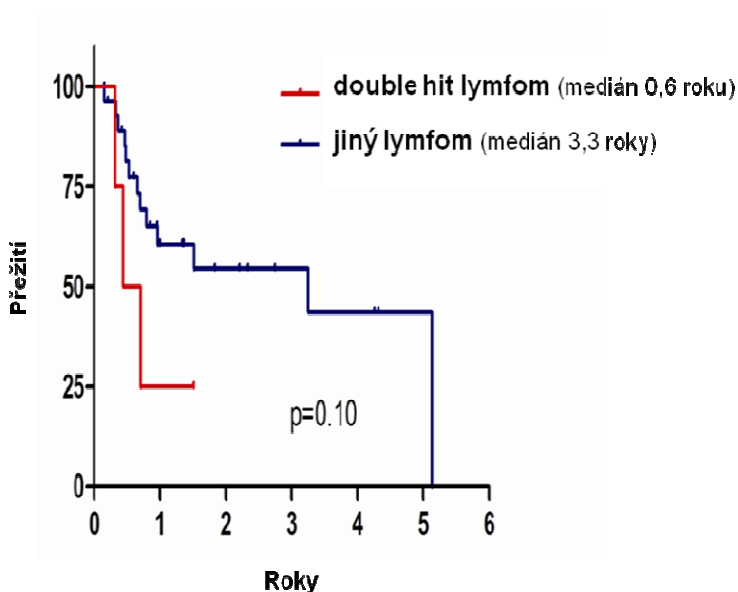
Tabulka 11. Základní charakteristika souboru.

	Double hit lymfomy	Ostatní
Počet pacientů	4	29
Diagnóza		
DLBCL	3 (75%)	26 (90%)
DLBCL/BL	1 (25%)	3 (10%)
Pohlaví - muži	3 (75%)	20 (69%)
- ženy	1 (25%)	9 (31%)
Věk	64,5 (58-69)	65,5 (23-77)
Klinické stádium		
I-II	1 (25%)	7 (21%)
III-IV	3 (75%)	22 (76%)
International Prognostic Index (IPI)		
Nízké	0	3 (10%)
Středně nízké	1 (25%)	6 (21%)
Středně vysoké	1 (25%)	4 (14%)
Vysoké	2 (50%)	15 (52%)
Velikost tumoru nad 10 cm	4 (100%)	11 (38%)
LD nad normu	4 (100%)	23 (79%)
Celkové příznaky	3 (75%)	15 (52%)
Uzlinové postižení	4 (100%)	24 (83%)
Extranodální postižení	3 (75%)	24 (83%)
Postižení kostní dřeně	1 (25%)	12 (41%)
Relaps/progrese	3 (75%)	9 (31%)
Úmrtí	3 (75%)	9 (31%)

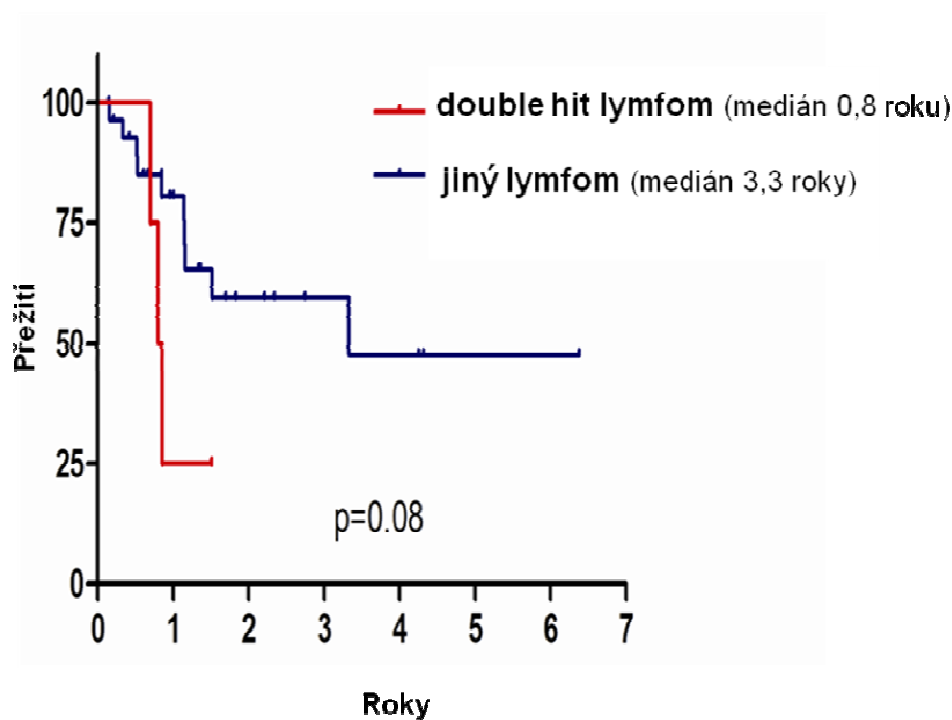
V souboru pacientů nebyly nalezeny významné klinické rozdíly, kromě bulky adenopatie (tumor větší než 10 cm) přítomné u všech nemocných s double hit lymfomem.

Rozdíly ve standardních parametrech přežívání – přežití bez progresce (PFS) a celkového přežití (OS) jsou patrné z křivek na **obrázcích 15** a **16**. Rozdíly byly statisticky hraničně významné vzhledem k malému počtu hodnocení.

Obrázek 15. Analýza přežití bez progresce (PFS).



Obrázek 16. Analýza celkového přežití (OS).



U pacientů s double hit lymfomem standardní terapie nepřináší uspokojivé výsledky. Tyto výsledky jsou v soulasu s publikovanými pracemi (Friedberg J.W., 2012; Oki Y. *et al.*, 2014), v současné době se zabýváme analýzou dalších nemocných a nemocných s folikulárními lymfomy. Optimalizace léčby je předmětem výzkumu.

Z této oblasti jsme zatím nepublikovali vlastní výsledky.

5.4.3. MCL

U NHL se věnujeme diagnóze lymfomu z buněk pláště MCL, který – podobně jako CLL – klinicky probíhá značně heterogenně. Metodou FISH v interfázních jádrech vyšetřujeme každého nemocného na přítomnost rekurentních diagnostických a potenciálně prognostických aberací sondami detekujícími translokaci t(11;14)(q13;q32) (jež vede k overexpresi cyklinu D1 přemístěním genu *CCND1* pod vliv promotoru *IgH* genu), delecí *ATM* a *TP53* genu, a delecí genu pro cyklin-dependentní kinázu 2a (*CDKN2A*). Tímto panelem sond jsme již vyšetřili 95 pacientů s MCL a výsledky zpracováváme.

Závěr kapitoly 5.4.:

Naše práce je zaměřená na využití molekulárně cytogenetických metod (zejména FISH) k diferenciální diagnostice a detekci aberací s prognostickým významem u NHL, a to jak na buňkách periferní krve, kostní dřeně i pleurálních výpotků, tak na veškerém bioptickém materiálu fixovaném ve formalinu, zalitém v parafinu.

6. Souhrn

V hodnoceném souboru bylo celkové přežití shodně s literaturou ovlivněno negativně delecí *ATM* a *TP53*, a naopak příznivě delecí oblasti 13q14. Prokázali jsme, že zatímco delece *IgVH* je průvodní jevem monoklonality a nemá vliv na pacientovu prognózu, translokace *IgH* genu zásadně závisí na druhém translokačním genu. Po vyloučení diagnostických translokací lze říci, že translokace genu *IgH* se u CLL vyskytují vzácně, stejně jako netypické nálezy CLL FISH panelu.

Potvrdili jsme, že nálezy FISH z PK i KD mají u CLL relevantní vypovídající hodnotou a poskytují prognosticky důležité informace ve srovnání s konvenční cytogenetickou analýzou.

Zabývali jsme se také významem vývoje klonu u CLL. Hodnocením každé kategorie KV zvláště jsme došli k výsledkům závislosti KV na sledovaných parametrech a významu pro celkové přežití. Zisk delece 13q14.3 a *ATM* v rámci KV souvisí pouze s dobou trvání choroby, ve smyslu čím déle pacient žije s CLL, tím má větší pravděpodobnost zisku těchto aberací, avšak na jeho přežití tyto dva typy KV dopad nemají. U zisku delece genu *TP53* v rámci KV je situace opačná. Tato kategorie KV závisí jak na negativních prognostických faktorech (nemutovaný status *IgVH*, CD38 a ZAP-70 pozitivita), tak na předchozí léčbě a znamená pro pacienta špatnou prognózu. V multivariantní analýze jsme prognostický vliv zisku delece *TP53* potvrdili.

V komentovaných výsledcích z naší publikované práce jsme významnou souvislost délky telomér s cytogenetickými aberacemi neprokázali. Kratší teloméry byly detekovány u nemocných s negativními prognostickými ukazateli, což nepřináší významnou informaci.

Nezastupitelnost molekulárně cytogenetických metod (zejména FISH) v diferenciální diagnostice a v prognostice NHL byla dokumentována - vzhledem k provázanosti problematiky, v celé práci. Zavedením metodiky FISH na histologických řezech v parafinu jsme zpřístupnili FISH analýzy všem typům biologického materiálu včetně archivních vzorků.

7. Seznam použité literatury

1. Autor neveden. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma (1997): The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*, 89(11):3909-18.
2. Autor neveden. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage (1982): The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*, 49(10):2112-35.
3. Armitage JO, Weisenburger DD (1998): New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*, 16(8):2780-95.
4. Auer RL, Bienz N, Neilson J, Cai M, Waters JJ, Milligan DW, Fegan CD (1999): The sequential analysis of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 104(4):742-4.
5. Austen B, Skowronska A, Baker C, Powell JE, Gardiner A, Oscier D, Majid A, Dyer M, Siebert R, Taylor AM, Moss PA, Stankovic T (2007): Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol*, 25(34):5448-57.
6. Bazargan A, Tam CS, Keating MJ (2012): Predicting survival in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*, 12(3):393-403.
7. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguat H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48(1):198-206.
8. Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, Beral HM, Natali JC, Raphael M, Nizet B, Follezou JY (1977): A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*, 40(2):855-64.
9. Blackburn EH (2001): Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6):661-73.
10. Bonadonna G (2000): Historical review of Hodgkin's disease. *Br J Haematol*, 110(3):504-11.
11. Brejcha M, Stoklasová M, Brychtová Y, Panovská A, Štěpanovská K, Vaňková G, Plevová K, Oltová A, Horká K, Pospíšilová Š, Mayer J, Doubek M (2014): Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization and conventional cytogenetics after stimulation with CpG oligonucleotides and interleukin-2: a prospective analysis. *Leuk Res*, 38(2):170-5.
12. Burger JA (2014): Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors in clinical trials. *Curr Hematol Malig Rep*, 9(1):44-9.

13. Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, Grever MR, Lozanski G, Lucas DM, Lampson B, Larson RA, Caligiuri MA, Heerema NA (2006): Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol*, 24(3):437-43.
14. Caligaris-Cappio F, Ghia P (2004): The nature and origin of the B-chronic lymphocytic leukemia cell: a tentative model. *Hematol Oncol Clin North Am*, 18(4), 849-862.
15. Caporaso N, Marti GE, Goldin L (2004): Perspectives on familial chronic lymphocytic leukemia: genes and the environment. *Semin Hematol*, 41(3):201-6.
16. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, Pettitt AR, Hamblin T, Milligan DW, Child JA, Hamilton MS, Dearden CE, Smith AG, Bosanquet AG, Davis Z, Brito-Babapulle V, Else M, Wade R, Hillmen P; UK National Cancer Research Institute (NCRI) Haematological Oncology Clinical Studies Group; NCRI Chronic Lymphocytic Leukaemia Working Group (2007): Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*, 370(9583):230-9.
17. Catovsky D, Wade R, Else M (2014): The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 99(6):1088-94.
18. Cavazzini F, Rizzotto L, Sofritti O, Daghia G, Cibien F, Martinelli S, Ciccone M, Saccenti E, Dabusti M, Elkareem AA, Bardi A, Tammiso E, Cuneo A, Rigolin GM (2012): Clonal evolution including 14q32/IGH translocations in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlations in 105 patients. *Leuk Lymphoma*, 53(1):83-8.
19. Cejkova S, Rocnova L, Potesil D, Smardova J, Novakova V, Chumchalova J, Zezulakova D, Borsky M, Doubek M, Brychtova Y, Pospisilova S, Klabusay M, Mayer J, Trbusek M (2009): Presence of heterozygous ATM deletion may not be critical in the primary response of chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *Eur J Haematol*, 82(2):133-42.
20. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005): miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(39):13944-9.
21. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E (2003): ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 348(18):1764-75.
22. Dameshek W (1967): Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*, ;29(4):Suppl:566-84.

23. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N (1999): Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6):1840-7.
24. Damle RN, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Wasil T, Batliwalla FM, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Gregersen PK, Ferrarini M, Chiorazzi N (2000): Chronic lymphocytic leukemia: a proliferation of B cells at two distinct stages of differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 252:285-92.
25. Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C (2000): Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol*, 28(5):558-68.
26. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, James CD, Jelinek DF, Tschumper RC, Hanson CA, Pruthi RK, Witzig TE, Call TG, Kay NE (2003): Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*, 121(2):287-95.
27. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL (1991): B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood*, 78(8):1901-14.
28. Döhner H, Pilz T, Fischer K, Cabot G, Diehl D, Fink T, Stilgenbauer S, Bentz M, Lichter P (1994): Molecular cytogenetic analysis of Rb-1 deletions in chronic lymphocytic leukemias. *Leuk Lymphoma*, 16(1-2):97-103.
29. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P (1997): 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterised by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, 89(7):2516-22.
30. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P (2000): Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 343(26):1910-6.
31. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, Wiktor-Jedrzejczak W, Niederwieser D, Hallek M, Montserrat E; Chronic Leukemia Working Party of the EBMT (2007): Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*, 21(1):12-7.
32. Dyer MJ, Oscier DG (2002): The configuration of the immunoglobulin genes in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 16(6):973-84.
33. Ferrarini M, Chiorazzi N (2004): Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*, 41(3):207-23.
34. Foon KA, Gale RP (1992): Is there a T-cell form of chronic lymphocytic leukemia? *Leukemia*, 6(9):867-8.

35. Fox X (1926): Remarks on microscopical preparations made from some of the original tissue described by Thomas Hodgkin, 1832. *Annals of Medicine History*, 8:370-374.
36. Friedberg JW (2012): Double-hit diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 30(28):3439-43.
37. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK (2010): National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. Jul 22;116(3):354-65.
38. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T (2007): Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*, 21(12):2442-51.
39. Haidar MA, El-Hajj H, Bueso-Ramos CE, Manshouri T, Glassman A, Keating MJ, Maher A (1997): Expression profile of MDM-2 proteins in chronic lymphocytic leukemia and their clinical relevance. *Am J Hematol*, 54(3):189-95.
40. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (2008): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111(12):5446-56.
41. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grünhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jäger U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Bühler A, Winkler D, Zenz T, Böttcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Döhner H, Stilgenbauer S; International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group (2010): Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 376(9747):1164-74.
42. Hamblin TJ (1997): Trisomy 12 in CLL revisited. *Leuk Res*, 21(11-12):1025-6.
43. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK (1999): Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6):1848-54.
44. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG (2002): CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, 99(3):1023-9.

45. Han T, Ozer H, Gavigan M, Gajera R, Minowada J, Bloom ML, Sadamori N, Sandberg AA, Gomez GA, Henderson ES (1984): Benign monoclonal B cell lymphocytosis--a benign variant of CLL: clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic studies in 20 patients. *Blood*, 64(1):244-52.
46. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC (1993): Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 82(6):1820-8.
47. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (1999): The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol*, 10(12):1419-32.
48. Heerema NA, Byrd JC, Dal Cin PS, Dell' Aquila ML, Koduru PR, Aviram A, Smoley SA, Rassenti LZ, Greaves AW, Brown JR, Rai KR, Kipps TJ, Kay NE, Van Dyke DL (2010): Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study. *Cancer Genet Cytogenet*, 203(2):134-40.
49. Hiyama E, Hiyama K (2007): Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer*, 96(7):1020-4.
50. Hodgkin T (1832): On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medical Chirurgical Transaction*, 17:69-97.
51. Hořejší V, Bartůňková J (2002): *Základy imunologie*. Praha: Triton.
52. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (Eds) (2014): *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014.
53. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, Weiss A, Kipps TJ (2005): ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 105(5):2036-41.
54. Chena C, Avalos JS, Bezares RF, Arrossagaray G, Turdó K, Bistmans A, Slavutsky I (2008): Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol*, 81(2):94-9.
55. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M (2005): Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 352(8):804-815.
56. Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M, Shay JW (1998): Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet*, 102(4):397-402.

57. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman (Eds.) (2001): WHO Classification of Tumours: Pathology & Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon
58. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG (2008): Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*, 112(12):4384-99.
59. Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, Bingman A, Flynn JM, Grever MR, Jones JA, Elder P, Devine SM, Byrd JC, Andritsos LA (2012): Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 159(1):82-7.
60. Jaksić B, Vitale B (1981): Total tumour mass score (TTM): a new parameter in chronic lymphocyte leukaemia. *Br J Haematol*, 49(3):405-13.
61. Jaksic O, Vrhovac R, Kusec R, Kardum MM, Pandzic-Jaksic V, Kardum-Skelin I, Planinc-Peraica A, Morabito F, Brugiattelli M, Jaksic B (2001): Clinical tumor cell distribution pattern is a prognostically relevant parameter in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 86(8):827-36.
62. Jamet D, Marzin Y, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2005): Jumping translocations in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*, 161(2):159-63.
63. Janssens A, Van Roy N, Poppe B, Noens L, Philippé J, Speleman F, Offner F (2012): High-risk clonal evolution in chronic B-lymphocytic leukemia: single-center interphase fluorescence in situ hybridization study and review of the literature. *Eur J Haematol*, 89(1):72-80.
64. Juliusson G, Gahrton G (1990): Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet*, 45(2):143-60.
65. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G (1990): Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*, 323(11):720-4.
66. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Ferrarini M, Kipps TJ (2003): Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 153-75.
67. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niino H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K (2011): Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, 20(2):246-59.
68. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC (1998): Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*, 91(9):3379-89.
69. Kolar GR, Capra JD (2004): Ig V region restrictions in human chronic lymphocytic leukemia suggest some cases have a common origin. *J Clin Invest*, 113(7):952-4.

70. Kotkowska A, Wawrzyniak E, Blonski JZ, Robak T, Korycka-Wolowiec A (2011): Chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia detected by conventional cytogenetics with DSP30 as a single agent: comparison with FISH. *Leuk Res*, 35(8):1032-8.
71. Kuppers R, Rajewsky K (1998): The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol*, 16:471-93.
72. Lazaridou A, Miraxtsi C, Korantzis J, Eleftheriadis N, Christakis JI (2000): Simultaneous detection of BCL-2 protein, trisomy 12, retinoblastoma and p53 monoallelic gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization (FISH): relation to disease status. *Leuk Lymphoma*, 36(5-6):503-12.
73. Lefranc MP, Lefranc G (2001): *The Immunoglobulin FactsBook*. San Diego: Academic Press.
74. Lewin B (2000): *Genes VII*. Oxford: Oxford University Press.
75. Liu G, Stevens JB, Horne SD, Abdallah BY, Ye KJ, Bremer SW, Ye CJ, Chen DJ, Heng HH (2014): Genome chaos: survival strategy during crisis. *Cell Cycle*, 13(4):528-37.
76. Liu Y, Grandér D, Söderhäll S, Juliusson G, Gahrton G, Einhorn S (1992): Retinoblastoma gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 4(3):250-6.
77. López C, Delgado J, Costa D, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, Gómez C, Arias A, Muñoz C, Cabezas S, Baumann T, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Pereira A, Cobo F, López-Guillermo A, Campo E, Carrió A (2013): Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: analysis of correlations with IGHV mutational status, NOTCH1 mutations and clinical significance. *Genes Chromosomes Cancer*, 52(10):920-7.
78. Loscertales J, Arranz E, Sanz MA, Blas C, Gil-Fernández JJ, Burgaleta C, Alegre A (2010): Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 51(6):1142-3.
79. Lukes RJ (1963): Relationship of histological features to clinical stages in Hodgkin's disease. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 90:944-55.
80. Malčíková J, Pospíšilová Š, Mayer J, Trbušek M (2010): Význam nádorového supresoru p53 u chronické lymfocytární leukemie. *Transfuzie a hematologie dnes*, 16(s1):29-32.
81. Matutes E, Catovsky D (1993): CLL should be used only for the disease with B-cell phenotype. *Leukemia*, 7(6):917-8.
82. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D (1996): Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*, 92(2):382-8.

83. Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglöf A, Vihinen M, Nore BF, Smith CI (2009): Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev*, 228(1):58-73
84. Molica S, De Rossi G, Luciani M, Levato D (1995): Prognostic features and therapeutical approaches in B-cell chronic lymphocytic leukemia: an update. *Haematologica*, 80(2):176-93.
85. Montserrat E (2004): Treatment options in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol J*, 5 Suppl 1:S2-9.
86. Mráz M, Pavlová Š, Malčíková J, Malinová K, Mayer J, Pospíšilová Š (2010): Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukemie. *Transfuze a hematologie dnes*, 16(s1):16-20.
87. Munk Pedersen I, Reed J (2004): Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma*, 45(12):2365-72.
88. Nair CN, Chougule A, Dhond S, Goyal R, Parikh PM, Pai S, Telang D, Advani SH (1998): Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia – geographical variation. *Leuk Res*, 22(4):313-7.
89. Naylor M, Capra JD (1999): Mutational status of Ig V(H) genes provides clinically valuable information in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6):1837-9.
90. Oki Y, Noorani M, Lin P, Davis RE, Neelapu SS, Ma L, Ahmed M, Rodriguez MA, Hagemester FB, Fowler N, Wang M, Fanale MA, Nastoupil L, Samaniego F, Lee HJ, Dabaja BS, Pinnix CC, Medeiros LJ, Nieto Y, Khouri I, Kwak LW, Turturro F, Romaguera JE, Fayad LE, Westin JR (2014): Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *Br J Haematol*, [Epub ahead of print]
91. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG (2004): ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 363(9403):105-11.
92. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, Matutes E, Milligan D; Guidelines Working Group of the UK CLL Forum. British Committee for Standards in Haematology (2004): Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 125(3):294-317.
93. Osorio LM, Aguilar-Santelises M (1998): Apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Med Oncol*, 15(4):234-40.
94. Oztürk S, Palanduz S, Aktan M, Cefle K, Serakinci N, Perkçelen Y (2000): Sister chromatid exchange frequency in B-cells stimulated by TPA in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 123(1):49-51.
95. Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C, Mitsoulis-Mentzikoff C, Matsouka-Alexandridis P, Anagnostopoulos N, Rombos I, Fessas P (1984): Patterns of bone marrow involvement in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic (well differentiated) non-Hodgkin's lymphoma. Its clinical significance in relation to their differential diagnosis and prognosis. *Cancer*, 54(4):702-8.

96. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 49(1):33-64.
97. Peková S, Marková J, Pajer P, Dvorák M, Cetkovský P, Schwarz J (2005): Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn*, 9(1):23-34.
98. Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T (2001): p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood*, 98(3):814-22.
99. Pileri SA, Sabattini E, Agostinelli C, Bodega L, Rossi M, Zinzani PL, Marafioti T (2004): Histopathology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 18(4):807-26.
100. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R (2009): Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol*, 6(7):405-18.
101. Pritsch O, Troussard X, Magnac C, Mauro FR, Davi F, Payelle-Brogard B, Dumas G, Pulik M, Clerget F, Mandelli F, Chiorazzi N, Schroeder HW Jr, Leporrier M, Dighiero G (1999): VH gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 107(3):616-24.
102. Pytlík R, Berková A, Ptáčník V (2013): Moderní diagnostika a léčba ne Hodgkinských lymfomů. *Interní Med*, 15(3-4):105-109.
103. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2):219-34.
104. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberger DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ (2004): ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 351(9):893-901.
105. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, Evans PA, O'Connor SJ, Richards SJ, Morgan GJ, Jack AS, Hillmen P (2002): Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*, 100(2):635-9.
106. Rawstron A, Hillmen P, Houlston R (2004): Clonal lymphocytes in persons without known chronic lymphocytic leukemia (CLL): implications of recent findings in family members of CLL patients. *Semin Hematol*, 41(3):192-200.
107. Rawstron AC (2013): Monoclonal B cell lymphocytosis--what does it really mean? *Curr Hematol Malig Rep*, 8(1):52-9.
108. Ricca I, Rocci A, Drandi D, Francese R, Compagno M, Lobetti Bodoni C, De Marco F, Astolfi M, Monitillo L, Vallet S, Calvi R, Ficara F, Omedè P, Rosato R, Gallamini A, Marinone C, Bergui L, Boccadoro M, Tarella C, Ladetto M (2007): Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*, 21(4):697-705.

109. Roitt IM, Delves PJ (2001): *Roitt's Essential Immunology*. Oxford: Blackwell.
110. Roos G, Kröber A, Grabowski P, Kienle D, Bühler A, Döhner H, Rosenquist R, Stilgenbauer S (2008): Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 111(4):2246-52.
111. Rossi D, Gaidano G (2009): Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol*, 27(1):1-10.
112. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, Deambrogi C, Khiabani H, Serra R, Bertoni F, Forconi F, Laurenti L, Marasca R, Dal-Bo M, Rossi FM, Bulian P, Nomdedeu J, Del Poeta G, Gattei V, Pasqualucci L, Rabadan R, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G (2013): Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121(8):1403-12.
113. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, Rasi S, Monti S, Deambrogi C, De Paoli L, Wang J, Gattei V, Guarini A, Foà R, Rabadan R, Gaidano G (2014): Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 123(14):2139-47.
114. Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E, Bruges R (1981): Prognostic significance of bone-marrow patterns in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 47(4):529-37.
115. Rozman C, Montserrat E (1995): Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 333(16):1052-7.
116. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (Eds.) (2009): *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature* (Karger, Basel, Switzerland)
117. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, Stockero KJ, Nast DM, Flynn HC, Tschumper RC, Geyer S, Zent CS, Call TG, Jelinek DF, Kay NE, Dewald GW (2006): Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 24(28):4634-41.
118. Shanafelt TD, Hanson C, Dewald GW, Witzig TE, LaPlant B, Abrahamson J, Jelinek DF, Kay NE (2008): Karyotype evolution on fluorescent in situ hybridization analysis is associated with short survival in patients with chronic lymphocytic leukemia and is related to CD49d expression. *J Clin Oncol*, 26(14):e5-6.
119. Shi M, Cipollini MJ, Crowley-Bish PA, Higgins AW, Yu H, Miron PM (2013): Improved detection rate of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms with use of CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2 stimulation. *Am J Clin Pathol*, 139(5):662-9.

120. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, Ohyashiki K, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lübbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau MM, Bennett JM, Greenberg P, Germing U, Haase D (2012): New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*, 30(8):820-9.
121. Schattner EJ (2000): CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy. *Leuk Lymphoma*, 37(5-6):461-72.
122. Schwarz J, Mikulenková D, Cermáková M, Polanská V, Michalová K, Marinov I, Campr V, Ransdorfová S, Marková J, Pavlistová L, Brezinová J, Sajdová J, Sponerová D, Volková Z, Benesová K, Cermák J, Vítek A, Cetkovský P (2006): Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic lymphocytic leukemia: correlations with IgVH gene mutational status and other prognostic markers. *Neoplasma*, 53(3):219-25.
123. Siegllová Z, Zilovcová S, Cermák J, Ríhová H, Brezinová D, Dvoráková R, Marková M, Maaloufová J, Sajdová J, Brezinová J, Zemanová Z, Michalová K (2004): Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leuk Res*, 28(10):1013-21.
124. Sindelárová L, Michalová K, Zemanová Z, Ransdorfová S, Brezinová J, Peková S, Schwarz J, Karban J, Cmunt E (2005): Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 160(1):27-34.
125. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ (2011): Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, 144(1):27-40.
126. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F (2004): Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 103(12):4389-95.
127. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H; German CLL Study Group (GCLLSG) (2002): Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and VH gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*, 16(6):993-1007.
128. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, Kröber A, Kienle D, Lichter P, Döhner H (2007): Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica*, 92(9):1242-5.
129. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.) (2008): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC, Lyon

130. Swiggers SJ, Kuijpers MA, de Cort MJ, Beverloo HB, Zijlmans JM (2006): Critically short telomeres in acute myeloid leukemia with loss or gain of parts of chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*, 45(3):247-56.
131. Štěpanovská K, Vaňková G, Némethová V, Tomášiková L, Smuhařová P, Divišková E, Vallová V, Kuglík P, Plevová K, Oltová A, Doubek M, Pospíšilová S, Mayer J (2013): Chromosome banding analysis of peripheral blood lymphocytes stimulated with IL2 and CpG oligonucleotide DSP30 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Klin Onkol*, 26(4):263-70.
132. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, Thomas DA, Cortes J, Lerner S, Keating MJ (2008): Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 112(4):975-80.
133. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Van Dyke DL, O'Brien S, Ferrajoli A, Lerner SA, Lynn A, Kay NE, Keating MJ (2009): De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*, 114(5):957-64.
134. Thurmes P, Call T, Slager S, Zent C, Jenkins G, Schwager S, Bowen D, Kay N, Shanafelt T (2008): Comorbid conditions and survival in unselected, newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 49(1):49-56.
135. Tomlinson IM, Cook GP, Walter G, Carter NP, Riethman H, Buluwela L, Rabbitts TH, Winter G (1995): A complete map of the human immunoglobulin VH locus. *Ann N Y Acad Sci*, 764:43-6.
136. Travella A, Ripollés L, Aventin A, Rodríguez A, Bezares RF, Caballín MR, Slavutsky I (2013): Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis. *Hematol Oncol*, 31(2):79-87.
137. Trněný M, Vášová I, Pytlík R, Belada D, Jankovská M, Kubáčková K, Šálková J, Kolečková E, Hofmanová Ž, Hrabětová Š, Kajaba V, Sýkorová A, Pirnos J, Příbylová J, Švecová J, Čiberová J, Bolomská I, Skácelíková E, Brejcha M, Adamová D (2007): Distribuce podtypů non-hodgkinského lymfomu v České republice a jejich přežití. *Klinická onkologie*, 20(5):341-348.
138. Trneny M, Obrtlíkova P, Schwarz J, Pavlik T, Muzik J, Dusek L (2011): Improving Survival in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia - Population Based Study. *Blood*, 118(21):1230-1230.
139. Urbankova H, Papajik T, Plachy R, Holzerova M, Balcarkova J, Divoka M, Prochazka V, Pikalova Z, Indrak K, Jarosova M (2014): Array-based karyotyping in chronic lymphocytic leukemia (CLL) detects new unbalanced abnormalities that escape conventional cytogenetics and CLL FISH panel. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158(1):56-64
140. Wawrzyniak E, Kotkowska A, Blonski JZ, Siemieniuk-Rys M, Ziolkowska E, Giannopoulos K, Robak T, Korycka-Wolowiec A (2014): Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance. *Eur J Haematol*, 92(2):91-101.

141. Wiernick PH, Canellos GP, Dutcher JP, Kyle RA (Eds.) (1996): *Neoplastic Diseases of the Blood*. New York: Churchill-Livingstone.
142. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM (2003): ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, 101(12):4944-51..
143. Wilks S (1856): Enlargement of the lymphatic glands and spleen, (or, Hodgkin's disease) with remarks. *Guy's Hospital Report*, 11:56-67.
144. Wu KD, Orme LM, Shaughnessy J Jr, Jacobson J, Barlogie B, Moore MA (2003): Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. *Blood*, 101(12):4982-9.
145. Wu X, Smoley SA, Peterson MA, Walters DK, Arendt BK, Nowakowski GS, Van Dyke DL, Kay NE, Jelinek DF (2011): Biological evaluation of CpG stimulation of normal human B-cells: implications for B-cell biology and cytogenetic analysis of CLL B-cells. *Br J Haematol*, 153(3):402-5.
146. Zemanova Z, Michalova K, Buryova H, Brezinova J, Kostylkova K, Bystricka D, Novakova M, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, Ransdorfova S, Krejcik Z, Merkerova MD, Dohnalova A, Siskova M, Jonasova A, Neuwirtova R, Cermak J (2014): Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk Res*, 38(5):537-44.
147. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwänen C, Döhner H, Stilgenbauer S (2008): Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, 112(8):3322-9.
148. Zhang S, Kipps TJ (2014): The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu Rev Pathol*, 9:103-18.
149. Zucchetto A, Caldana C, Benedetti D, Tissino E, Rossi FM, Hutterer E, Pozzo F, Bomben R, Dal Bo M, D'Arena G, Zaja F, Pozzato G, Di Raimondo F, Hartmann TN, Rossi D, Gaidano G, Del Poeta G, Gattei V (2013): CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood*, 122(19):3317-21.

8. Seznam příloh

Příloha č. 1: Berková A, Michalová K. *Cytogenetika u CLL*. Kapitola v Supplementu o CLL – Projekt CELL a České skupiny pro CLL.

Transfuzní a hematologické zprávy 2010;16(s1):52-5.

Příloha č. 2: Berková A, Pavlišťová L, Babická L, Houšková L, Tajtlová J, Baláží P, Cmunt E, Schwarz J, Karban J, Trněný M, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K. *Combined molecular biological and molecular cytogenetic analysis of genomic changes in 146 patients with B-CLL*.

Neoplasma 2008;55(5):400-8.

Příloha č. 3: Berková A, Zemanová Z, Trněný M, Schwarz J, Karban J, Cmunt E, Pavlišťová L, Březinová J, Michalová K. *Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization*.

Neoplasma 2009;56(5):455-8.

Příloha č. 4: Březinová J, Berková A, Včelíková S, Zemanová Z, Izáková S, Šárová I, Čechová H, Tajtlová J, Grosová L, Lizcová L, Malinová E, Zemanová M, Cmunt E, Karban J, Trněný M, Schwarz J, Michalová K. *Telomere length, molecular cytogenetic findings, and immunophenotypic features in previously untreated patients with B-chronic lymphocytic leukemia*.

Neoplasma 2010;57(3):215-21.

Příloha č. 5: Gančarčíková M, Zemanová Z, Březinová J, Včelíková S, Berková A, Šmigová J, Michalová K: *The role of telomeres and telomerase complex in haematological neoplasia: The length of telomeres as a marker of carcinogenesis and prognosis of disease*.

Prague Medical Report 2010;111(2):91-105.

Příloha č. 6: Sarová I, Březinová J, Lhotská H, Berková A, Ransdorfová S, Zemanová Z, Soukupová J, Michalová K. *Jumping-like translocation—a rare chromosomal rearrangement in a patient with Burkitt lymphoma/leukemia*.

Cancer Genet. 2014 May;207(5):221-5.

9. Publikace

Publikace přímo související s tématem disertační práce

Berková A, Pavlišťová L, Babická L, Houšková L, Tajtlová J, Baláži P, Cmund E, Schwarz J, Karban J, Trněný M, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K: Combined molecular biological and molecular cytogenetic analysis of genomic changes in 146 patients with B-CLL. *Neoplasma* 2008;55(5):400-8. **IF 1.179**

Berková A, Zemanová Z, Trněný M, Schwarz J, Karban J, Cmund E, Pavlišťová L, Březinová J, Michalová K: Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization. *Neoplasma* 2009;56(5):455-8. **IF 1.192**

Berková A, Michalová K. Cytogenetika u CLL. Kapitola v Suplementu o CLL – Projekt CELL a České skupiny pro CLL. *Transfúze a hematologie dnes* 2010;16(s1):52-5. **IF 0**

Březinová J, Berková A, Včelíková S, Zemanová Z, Izáková S, Šárová I, Čechová H, Tajtlová J, Grosová L, Lizcová L, Malinová E, Zemanová M, Cmund E, Karban J, Trněný M, Schwarz J, Michalová K: Telomere length, molecular cytogenetic findings, and immunophenotypic features in previously untreated patients with B-chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 2010;57(3):215-21. **IF 1.449**

Gančarčíková M, Zemanová Z, Březinová J, Včelíková S, Berková A, Šmigová J, Michalová K: The role of telomeres and telomerase complex in haematological neoplasia: The length of telomeres as a marker of carcinogenesis and prognosis of disease. *Prague Medical Report* 2010;111(2):91-105. **IF 0**

Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T: MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117(14):3816-25. **IF 10.558**

Pytlík R, Berková A, Ptáčník V: Moderní diagnostika a léčba ne Hodgkinských lymfomů. *Interní Med* 2013;15(3-4):105-9. **IF 0**

Sarova I, Brezinova J, Lhotska H, Berkova A, Ransdorfova S, Zemanova Z, Soukupova J, Michalova K: Jumping-like translocation-a rare chromosomal rearrangement in a patient with Burkitt lymphoma/leukemia. *Cancer Genet* 2014; 207(5):221-5. **IF13 2.417**

Pytlík R, Belada D, Kubáčková K, Vášová I, Kozák T, Pirnos J, Bolomská I, Matuška M, Příbylová J, Campr V, Burešová L, Sýkorová A, Berková A, Klener P, Trněný M: Treatment of high-risk aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas with rituximab, intensive induction and high-dose consolidation: long-term analysis of the R-MegaCHOP-ESHAP-BEAM Trial. *Leuk Lymphoma* 2014 [Epub ahead of print] **IF13 2.605**

Ostatní publikace

Berková A, Dundr P, Povýšil C, Melčáková S, Tvrdík D: A comparison of RT-PCR and FISH techniques in molecular diagnosis of Ewing's sarcoma in paraffin-embedded tissue.

Cesk Patol. 2008;44(3):67-70. **IF 0**

Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Lizcová L, Berková A, Izáková S, Malinová E, Fuchs O, Kostečka A, Provazníková D, Filkuková J, Maaloufová J, Starý J, Michalová K: A partial nontandem duplication of the MLL gene in four patients with acute myeloid leukemia.

Cancer Genetics and Cytogenetics 2009;195(2):150-6. **IF 1.537**

Dundr P, Fischerová D, Povýšil C, Berková A, Bauerová L, Cibula D: Uterine Tumors with Neuroectodermal Differentiation. A Report of 4 Cases.

Pathol Oncol Res 2010 Dec;16(4):601-8. **IF 1.483**

Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Izáková S, Lizcová L, Malinová E, Berková A, Čermák J, Maaloufová J, Nováková L, Michalová K: Cytogenetic manifestation of the chromosome 11 duplication/amplification in acute myeloid leukemia.

Cancer Genetics and Cytogenetics 2010;199(2):121-7. **IF 1.551**

Bystřická D, Zemanová Z, Březinová J, Gančarčíková M, Grosová L, Šárová I, Izáková S, Berková A, Michalová K: The assessment of array comparative hybridization in complex karyotype analyses.

FOLIA BIOLOGICA 2010;56(5):223-30. **IF 0.729**

Tvrđik D, Skalova H, Dundr P, Povysil C, Velenska Z, Berkova A, Stanek L, Petruzelka L: Apoptosis - associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer treatment.

Med Sci Monit 2012;18(1):BR60-67. **IF 1.358**

Pavlistova L, Zemanova Z, Sarova I, Lhotska H, Berkova A, Spicka I, Michalova K: Change in ploidy status from hyperdiploidy to near-tetraploidy in multiple myeloma associated with bortezomib/lenalidomid resistance.

Cancer Genet 2014 [In press] **IF13 2.417**