

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2022**

**Bc. Eliška Hladíková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Cytogenetika a molekulární cytogenetika  
u pacientů s chronickou lymfocytární  
leukémií (CLL) se zaměřením na trizomie  
chromozomu 12**

**Diplomová práce**

**Bc. Eliška Hladíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2022**

**Vedoucí práce: Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Eliška HLADÍKOVÁ
Osobní číslo:	R20906
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Molekulární a buněčná biologie
Téma práce:	Cytogenetika a molekulární cytogenetika u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) se zaměřením na trizomie chromozomu 12
Zadávající katedra:	Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější leukémií dospělého věku v západních zemích. Vyznačuje se klonální expanzí nezralých B-lymfocytů s typickou morfologií a imunofenotypem do periferní krve, kostní dřeně a lymfatických uzlin. Jedná se o heterogenní onemocnění s různým průběhem i délkou přežívání nemocných, kde významnou úlohu v určení prognózy má i cytogenetika. Cytogenetické změny se vyskytují až u 80 % pacientů a nejčastěji se jedná o delece oblasti 13q14, trizomii chromozomu 12, delece genů *ATM* a *TP53*, přestavbu genu *IGH*, delecii oblasti 6q21 nebo aberace genu *MYC*. Trizomie chromozomu 12 je u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií relativně častá, vyskytuje se až u 20 % pacientů. I přesto však není znám přesný prognostický význam. Trizomie 12 byla pozorována jak u typické, tak u atypické formy CLL a dle „klasické“ Döhnerovy klasifikace jsou pacienti s +12 zařazeni do středního prognostického rizika.

Cíle:

1. Vypracovat literární rešerši na dané téma.
2. Pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) vyhodnotit genetické změny u souboru pacientů s CLL a určit incidenci výskytu trizomie 12.
3. U souboru pacientů s trizomií 12 určit pomocí aCGH (array komparativní genomové hybridizace) její varianty, vyhodnotit nejčastěji přidružené cytogenetické změny a statisticky analyzovat.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Papajik T., Plachy R., Indrak K.: *Chronická B-lymfocytární leukemie; Část I: Pohled na původ, biologii a genetické u leukemických buněk*. Transfuzie a hematologie dnes, 2006; 2: p. 9.

Michalova K.: *Úvod do lidské cytogenetiky*. Národní centrum ošetrovatelství, 1999. 172 s. ISBN 80-7013-281-7.

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

Kruzova L., Papajik T., Urbankova H.: *Chromozomové změny u chronické lymfocytární leukemie, jejich prognostický a prediktivní význam*. Transfuzie a Hematologie Dnes, 2020; 26(1): p. 19-28.

Matutes E, et al.: *Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients*. Br J Haematol, 1996; 92(2): p. 382-388.

Que TH, et al.: *Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology.* Blood, 1993; 82(2): p. 571-575.

Chigrinova E, et al.: *Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome.* Blood, 2013; 122(15): p. 2673-2682.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.**  
Hemato-onkologická klinika

Datum zadání diplomové práce: **30. listopadu 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2022**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Pohoří  
tel.: +420 585 634 901  
L.S.  15-04-2021  
-2-

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

## **Bibliografické údaje**

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Hladíková
Název práce	Cytogenetika a molekulární cytogenetika u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) se zaměřením na trizomie chromozomu 12
Typ práce	diplomová
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Klíčová slova	trizomie 12, chronická lymfocytární leukémie, cytogenetika, array komparativní genomová hybridizace
Počet stran	46
Počet příloh	0
Jazyk	český

## **SOUHRN**

Tato práce se zabývá cytogenetikou a molekulární cytogenetikou u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a podrobněji se zaměřuje na pacienty s trizomií chromozomu 12. CLL je klonální lymfoproliferativní onemocnění, které vzniká v důsledku poruchy apoptózy a klonální proliferace zralých B-lymfocytů akumulujících se v těle nemocných. Onemocnění je charakteristické velmi heterogenním průběhem. K určení prognózy pacientů, jejich stádia a stanovení strategie léčby CLL slouží prognostické markery, mezi které patří i genetické změny. K jejich detekci se používají metody klasické cytogenetiky, fluorescenční *in situ* hybridizace a array komparativní genomové hybridizace. V rámci diplomové práce byli vybráni pacienti s detekovanou trizomií 12 léčení na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. U tohoto souboru pacientů byla statisticky vyhodnocena přítomnost chromozomových aberací a jejich dopad na průběh onemocnění.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Bc. Eliška Hladíková
Title	Cytogenetics and molecular cytogenetics in patients with chronic lymphocytic leukemia with a focus on the trisomy of chromosome 12
Type of thesis	master
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.
The year of presentation	2022
Keywords	trisomy 12, chronic lymphocytic leukemia, cytogenetics, array comparative genomic hybridization
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

## **SUMMARY**

This thesis deals with cytogenetics and molecular cytogenetics in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and focuses on patients with trisomy 12. CLL is a clonal lymphoproliferative disorder which is caused by impaired apoptosis and clonal proliferation of mature B cells accumulating in the body of patients. The disease is characterized by a very heterogeneous course. Prognostic markers, including genetic changes, are used to determine the prognosis, patient stage and treatment strategy for CLL. Methods of classical cytogenetics, fluorescent *in situ* hybridization and array comparative genomic hybridization are used for their detection. For the purposes of the diploma thesis, patients with detected trisomy 12, treated at Department of Hemato-oncology University Hospital Olomouc, were selected. In this group of patients, the presence of chromosomal aberrations and their impact on the course of the disease, were statistically evaluated.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucí práce Mgr. Heleny Urbánkové, Ph.D. a za pomoci uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne: .....

Podpis: .....

Bc. Eliška Hladíková

## Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Heleně Urbánkové, Ph.D. za ochotu, trpělivost a čas, který mi byla ochotna věnovat a za odborné vedení a rady při zpracování této práce. Dále děkuji Mgr. Lence Krůzové, Ph.D. za konzultaci a uvedení do tématu diplomové práce a RNDr. Tomáši Fürstovi, Ph.D. za provedení statistické analýzy dat. Také bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům pracujícím v laboratoři Cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci za jejich pomoc a rady při práci v laboratoři.

Tato práce byla podpořena grantem *IGA\_LF\_2022\_001*.



## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
3.1	Hematopoéza .....	3
3.1.1	Hematopoéza během prenatalního období .....	3
3.1.2	Hematopoéza během postnatalního období .....	4
3.2	Chronická lymfocytární leukémie .....	6
3.2.1	Obecná charakteristika .....	6
3.2.2	Prognostické faktory .....	7
3.2.3	Molekulárně cytogenetické prognostické faktory .....	9
3.2.4	Léčba .....	12
3.3	Cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody .....	12
3.3.1	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	13
3.3.2	Array komparativní genomová hybridizace (aCGH) .....	14
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>17</b>
4.1	Biologický materiál .....	17
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	17
4.2.1	Použité chemikálie .....	17
4.2.2	Použité soupravy .....	17
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	17
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	18
4.4.1	Metodický postup aCGH .....	18
4.4.2	Statistická analýza .....	22
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>23</b>
5.1	Soubor pacientů .....	23
5.2	Cytogenetické a molekulárně cytogenetické výsledky .....	25
5.3	Statistické vyhodnocení dat .....	28
5.4	Příklady výsledků aCGH u vybraných pacientů .....	31
<b>6</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>39</b>

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

aCGH	array komparativní genomová hybridizace
AGM	aorta-gonády-mezonefros
BAC	umělý bakteriální chromozom
CGH	komparativní genomová hybridizace
CLL	chronická lymfocytární leukémie
FCR	fludarabin, cyklofosfamid, rituximab
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
gDNA	genomová DNA
HSC	hematopoetické kmenové buňky
LDH	laktátdehydrogenáza
MDR	minimální deletovaná oblast
NCI	National Cancer Institute
WHO	World Health Organization
YAC	umělý kvasinkový chromozom

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Schématické znázornění fází hematopoézy v závislosti na velikosti plodu (převzato a upraveno z Perinatal Medicine Foundation, 2021)
- Obrázek 2: Orgány imunitního systému (převzato a upraveno z BYJU'S, 2021)
- Obrázek 3: Schématické znázornění postupu fluorescenční *in situ* hybridizace (převzato a upraveno z Creative BioMart, 2021)
- Obrázek 4: Schématické znázornění postupu array komparativní genomové hybridizace (převzato a upraveno z Creative Bioarray, 2021)
- Obrázek 5: Poměr pacientů s trizomií 12 s klinickými stádii podle Bineta
- Obrázek 6: Poměr vyšetřovaného materiálu pacientů s trizomií 12
- Obrázek 7: Poměr zastoupení počtu chromosomálních změn u souboru pacientů s trizomií 12 vyšetřovaných metodou FISH
- Obrázek 8: Poměr četnosti zastoupení všech cytogenetických aberací u souboru pacientů s trizomií 12 vyšetřovaných metodou FISH
- Obrázek 9: Rozsah parciálních trizomií na chromozomu 12
- Obrázek 10: Poměr pacientů s trizomií 12 s mutovaným a nemutovaným genem *IGHV*
- Obrázek 11: Procentuální zastoupení trizomie chromozomu 12 v jednotlivých skupinách stanovené pomocí Kruskalova–Wallisova testu
- Obrázek 12: Zastoupení solo trizomie chromozomu 12 oproti trizomii chromozomu 12 vyskytující se současně s dalšími změnami v jednotlivých skupinách stanovené pomocí chí-kvadrát testu
- Obrázek 13: Zastoupení pacientů s delecí 13q14 oproti pacientům bez delecce 13q14 v jednotlivých skupinách stanovené pomocí chí-kvadrát testu
- Obrázek 14: Výsledek aCGH u pacienta 12 s trizomií chromozomu 12
- Obrázek 15: Výsledek aCGH u pacienta 36 se zmnožením na chromozomu 12

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Klinická stádia CLL podle Raie

Tabulka 2: Klinická stádia CLL podle Bineta

Tabulka 3: Složení hybridizačního Master Mixu pro 4čipovou mikroarray

Tabulka 4: Reakční podmínky pro restriční štěpení

Tabulka 5: Složení značícího Master Mixu pro 4čipovou mikroarray

Tabulka 6: Reakční podmínky pro značení DNA

Tabulka 7: Složení hybridizačního Master Mixu pro 4čipovou mikroarray

Tabulka 8: Základní údaje o souboru pacientů s trizomií 12

# 1 ÚVOD

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastějším typem leukémie dospělých v rozvinutých zemích. Jde o klonální maligní lymfoproliferativní onemocnění vznikající v důsledku poruchy apoptózy a klonální proliferace zralých B-lymfocytů, které se akumulují v těle nemocných. Těmi bývají nejčastěji muži nad 60 let věku. Při určení prognózy pacientů a stanovení optimálního léčebného postupu záleží kromě fyzického stavu, věku, pohlaví, také na chromozomových aberacích a genových mutacích, které jsou stanovovány pomocí cytogenetických, molekulárně-cytogenetických a molekulárně-biologických metod.

Mezi nejčastější chromozomové změny patří delece oblastí 6q21, 11q22–23 (*ATM*), 13q14, 17p13 (*TP53*), duplikace oblasti 8q24, trizomie chromozomu 12 a přestavba genu *IGH*. Dalším velice významným prognostickým markerem je mutační status genu pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů (*IGHV*). U pacientů se nachází pak celá řada dalších aberací, u kterých však není známý jejich prognostický význam. Nález komplexního karyotypu (současný výskyt tří a více klonálních aberací) je spojený s nutností dřívějšího nasazení léčby a s kratším celkovým přežitím. Kromě klasického cytogenetického vyšetření pruhovacími technikami se tyto změny detekují metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tato metoda využívá fluorescenčně značených DNA sond, které lokalizují jednotlivé vybrané aberace. Tuto techniku pak doplňuje array komparativní genomová hybridizace (aCGH) umožňující analýzu nebalancovaných změn celého genomu. Za pomoci sekvenčních technik jako je Sangerova metoda nebo sekvenování nové generace se detekují mutace v genech, který mají také důležitý prognostický význam u CLL, např. *TP53* a *NOTCH1*. Výsledky těchto analýz, jejich kombinace a korelace s klinickým stavem jsou pak důležité pro stanovení léčby pacientů s CLL.

## **2 CÍLE PRÁCE**

Cílem této diplomové práce bylo (i) vypracovat literární rešerši na dané téma, (ii) pomocí metody aCGH vyhodnotit genetické změny u pacientů s CLL a (iii) u podsouboru pacientů s detekovanou trizomií 12 určit její rozsah, vyhodnotit současný výskyt dalších chromozomových aberací a statisticky analyzovat jejich dopad na délku intervalu do nasazení první léčby.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

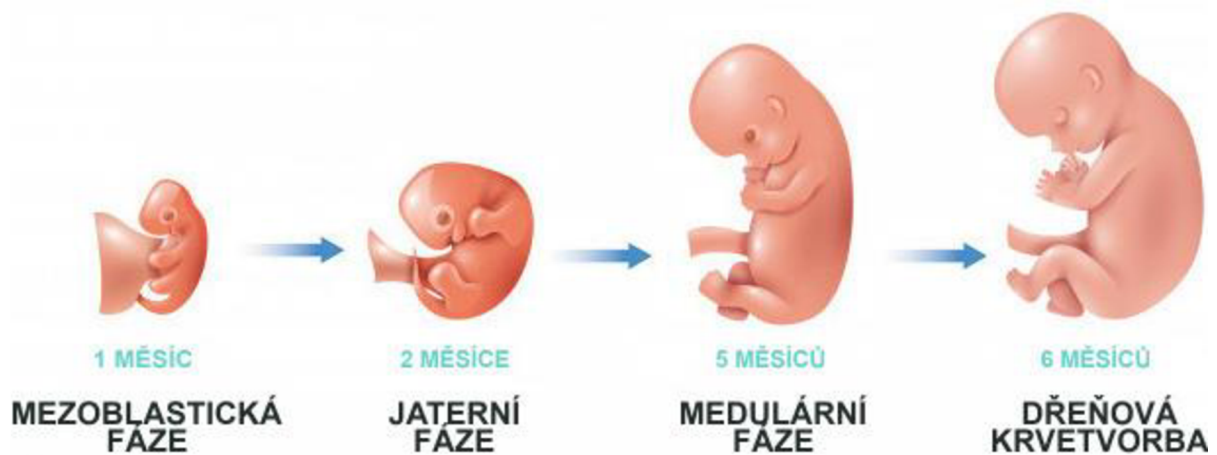
### 3.1 Hematopoéza

Hematopoéza je proces, při němž dochází k tvorbě krve v organismu. Jedná se o velmi dynamický děj vyžadující neustálou koordinaci mnoha buněčných dějů po celou dobu života organismu. Ke vzniku jednotlivých krevních složek dochází jak během embryonálního vývoje, tak i v postnatálním období, kdy dochází k doplnění krevního objemu. Krev je jednou z nejvíce regenerativních a plastických tkání v těle a její komponenty jsou během života každou sekundu doplňovány novými. V kritických situacích, jakými mohou být anémie nebo infekce, se počet krvinek rychle zvyšuje. Počet buněk po zotavení pak opět klesá k běžným hodnotám. Životnosti různých zralých typů krevních buněk se pohybují od hodin do několika let. Veškeré složky krve se vyvíjejí z hematopoetických kmenových buněk (HSC, hematopoetic stem cells), které se nacházejí převážně v kostní dřeni, což je hlavní místo hematopoézy dospělých. Zároveň jsou HSC nejvíce studované kmenové buňky (Rieger *et* Schroeder, 2012).

#### 3.1.1 Hematopoéza během prenatálního období

V raných fázích dochází k embryonálnímu vývoji při absenci jakýchkoli krevních buněk. Teprve poté, co embryo dosáhne velikosti, při které může být zásobeno kyslíkem a dalšími základními látkami pomocí difúze, se poprvé začínají vytvářet krevní buňky (Rieger *et* Schroeder, 2012). Podle toho, kde v embryu dochází ke krvetvorbě, rozlišujeme tři fáze embryonální hematopoézy: mezoblastickou, jaterní a medulární fázi.

Počáteční vývoj primitivních hematopoetických buněk začíná během prvních dvou týdnů embryonálního vývoje po oplodnění tzv. mezoblastickou fází ve žloutkovém vaku (Singh *et al.*, 2021). Tato fáze hematopoézy probíhá extraembryonálně, tedy vně plodu (Galloway *et* Zon, 2003). Část buněk tvoří v centrální dutině žloutkového vaku především primitivní erytroblasty obsahující buněčné jádro (Lexová, 2000). Tyto komponenty jsou v časně embryogenezi důležité pro produkci hemoglobinu potřebného pro dodávání kyslíku do rychle se rozvíjejících embryonálních tkání (Keohane, 2016). Část buněk mezodermálního původu také migruje do oblasti aorta-gonádni-mezonefros (AGM), kde dochází k tvorbě prvních buněk s funkčními vlastnostmi HSC (Rieger *et* Schroeder, 2012). Dle studií z posledních let je právě tato oblast klíčová pro embryonální hematopoézu, jelikož krvetvorba ve žloutkovém vaku časem zaniká (Easterbrook *et al.*, 2019).



Obrázek 1: Schématické znázornění fází hematopoézy v závislosti na velikosti plodu (převzato a upraveno z Perinatal Medicine Foundation, 2021)

Jaterní fáze hematopoézy začíná v pátém až šestém týdnu těhotenství a až do šestého měsíce jsou játra klíčovou oblastí hematopoézy (Lexová, 2000). Na počátku této fáze HSC migrují z oblasti AGM do jater a také do placenty plodu. K hematopoetickému procesu ale v tomto období přispívají všechny krvetvorné tkáně, tedy vyvíjející se slezina, ledviny, brzlík, placenta a lymfatické uzliny. Brzlík, který je prvním plně vyvinutým orgánem plodu, se stává hlavním místem produkce T-buněk, zatímco ledviny a slezina produkují především B-buňky (Keohane, 2016). Hematopoéza v oblasti AGM a žloutkového vaku mezitím zaniká. Tato fáze je opět charakteristická shluky vyvíjejících se erytroblastů, které již ale buněčné jádro ztrácí (Lexová, 2000). Kromě toho v játrech vzniká i množství granulocytů a makrofágů, které se v pozdějším období začínají usazovat i v prostorech kostní dřeně (Payushina, 2012).

Jak je možné vidět na obrázku 1, mezi čtvrtým a pátým měsícem těhotenství se během medulární fáze začíná centrum hematopoézy přesouvat do dutiny kostní dřeně. V tomto období vnikají nejdříve v klíčních a následně ve všech kostech plodu dutiny vyplněné prokrvenou pojivovou tkání, do kterých se HSC a mezenchymální buňky přesouvají (Lexová, 2000). Na konci šestého měsíce těhotenství se kostní dřeň stává primárním místem hematopoézy, avšak krvetvorba mimo tuto oblast zaniká až po dvou až třech týdnech po narození. Mezenchymální buňky se během tohoto období dále diferencují na strukturální prvky, které podporují vyvíjející se krvinky (Keohane, 2016).

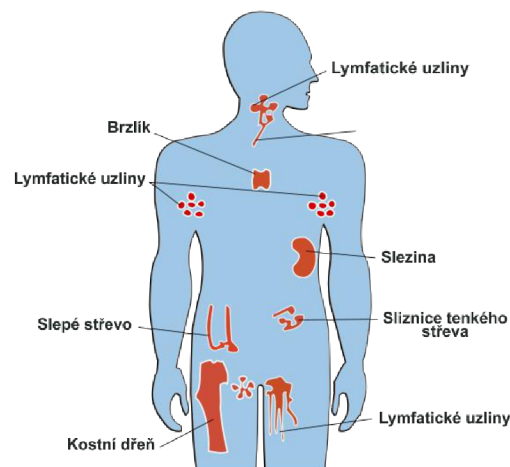
### 3.1.2 Hematopoéza během postnatálního období

Po narození už hematopoéza probíhá ve vysoce specializovaných lymfatických orgánech



a tkáních, především v kostní dřeni, lymfatických uzlinách, slezině, játrech a brzlíku. Tyto orgány imunitního systému se rozlišují na primární a sekundární lymfatické tkáně. Primární lymfatická tkáň je místem, kde dochází k maturaci a diferenciaci T a B buněk. Mezi tuto skupinu se řadí kostní dřeň a brzlík. Kostní dřeň je houbovitá tkáň vyplňující vnitřní dutiny dlouhých kostí. Z hlediska krve tvorby je důležitá hustě inervovaná a prokrvená červená kostní dřeň, jejíž buňky vylučují množství cytokinů. Hlavním úkolem kostní dřene je udržování hematopoetické homeostázy, tedy rovnováhy mezi proliferací a diferenciací hematopoetických kmenových a progenitorových buněk. Kostní dřeň je také hlavním zdrojem HSC, ze kterých jsou diferenciací produkovány erytrocyty a většina buněk imunitního systému, především B-lymfocyty (Wang *et al.*, 2018). V brzlíku naproti tomu dochází k dozrávání T-lymfocytů (Flajnik, 2011).

Sekundární lymfatická tkáň, hrající hlavní roli při reakci na cizí antigeny a imunitní odpovědi, se sestává z lymfatických uzlin, sleziny a lymfatické tkáně spojené se sliznicí (Keohane, 2016). Lymfatické uzliny jsou malé tkáně ve tvaru fazole fungující jako filtry lymfatických cév. Buňky imunitního systému v uzlinách zachycují patogeny migrující lymfatickými cévami a aktivují tvorbu protilátek v krvi, což se může projevit oteklými nebo bolestivými lymfatickými uzlinami. Slezina je zásobárnou buněk imunitního systému, které mohou být krví transportovány do jiných orgánů a taktéž funguje stejně jako lymfatické uzliny. Sliznice je při imunitní odpovědi důležitá hlavně v oblasti střev. Střevní sliznice, obzvláště konec tenkého střeva a slepé střevo (viz Obrázek 2), obsahují více než polovinu všech buněk produkujících protilátky. Buňky detekují patogeny, označí je, a vyvolají imunitní odpověď vedoucí k jejich zničení. Sliznice podporující imunitní systém je ale i součástí dýchacích a močových cest a pochvy.



Obrázek 2: Orgány imunitního systému (převzato a upraveno z BYJU'S, 2021)

## 3.2 Chronická lymfocytární leukémie

### 3.2.1 Obecná charakteristika

Leukémie jsou heterogenní skupinou hematologických chorob, při kterých dochází k maligní transformaci a klonální proliferaci hematopoetických buněk (Davis *et al.*, 2014). Podle toho, jaké progenitorové buňky postihuje, lze tuto nemoc dělit do dvou kategorií: myeloidní a lymfoidní. Podle klinického průběhu se pak myelózy a lymfadenózy dělí na akutní a chronické. Akutní leukémie mají velmi rychlý vývoj, jsou typické abnormálními buňkami, které způsobují dysfunkci kostní dřeně. Oproti tomu chronické leukémie mají velmi pomalý průběh, a proto se jejich příznaky mohou projevit až po letech od začátku nemoci (Lyengar *et Shimanovsky*, 2021).

Pro chronickou lymfocytární leukémii (CLL) je charakteristická klonální proliferace, porucha apoptózy a akumulace zralých B-lymfocytů v kostní dřeni, lymfatických uzlinách, slezině a periferní krvi, kde je jejich výskyt na jeden litr nad  $5 \cdot 10^9$ . Lymfocyty jsou zralé, malé a jejich velikost nepřesahuje dvojnásobek velikosti erytrocytů. Mají kulatý tvar, stejně jako jejich jádro obsahující hutný kondenzovaný chromatin, bez jádérka (Starostka *et Mikula*, 2014). S výskytem 5 případů na 100 000 obyvatel je chronická lymfocytární leukémie nejčastějším typem leukémie u dospělých v rozvinutých zemích. Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO, *World Health Organization*) z roku 2017 je průměrným věkem, kdy je tato nemoc diagnostikována v USA, Evropě a Austrálii, cca 70 let (Swerdlow *et al.*, 2017). V Asii je toto onemocnění méně časté. Až dvakrát častěji jsou také diagnostikováni muži, u kterých je i větší pravděpodobnost vývoje nemoci. Průběh tohoto onemocnění se u jednotlivých pacientů velice různí, od lehkých případů až po pacienty s velmi agresivním vývojem nemoci. Tato nestejnorodost má také dopad na léčebnou strategii, přístup k onemocnění, a nakonec i na dobu přežití od diagnózy (Puiggros *et al.*, 2014).

Patogeneze CLL není doposud plně objasněna. Nicméně v současné době dochází k stále většímu pochopení procesu, při kterém dochází k leukemogenní transformaci. Kromě narušení apoptotických drah a vlivu mikroprostředí hrají důležitou roli při vzniku a vývoji onemocnění chromozomové aberace a genové mutace. Nedávná komplexní analýza genomů skupiny pacientů trpících CLL ukazuje, že onemocnění může být až v 80 % iniciováno ztrátou nebo duplikací části chromozomu, následovanou dalšími mutacemi, které mohou zvýšit agresivitu chronické lymfocytární leukémie (Hallek, 2019). I přes široké spektrum genomových aberací

se CLL, ve srovnání s jinými hematologickými malignitami nebo i jinými typy nádorů, vyznačuje relativně stabilním genomem (Puiggros *et al.*, 2014).

### 3.2.1.1 Richterova transformace

Richterova transformace je závažná komplikace chronické lymfocytární leukémie. Jen ve Spojených státech amerických je diagnostikováno kolem 500 pacientů ročně a její výskyt se pohybuje od 2 do 10 % pacientů s CLL (Molica, 2010). Jde o transformaci v rychle rostoucí lymfom, nejčastěji difuzní velkobuněčný B lymfom nebo např. v Hodgkinův lymfom. Kromě velmi špatné prognózy je Richterova transformace odolná vůči léčbě. Mezi prognostické faktory patří zdravotní stav pacienta, hodnota LDH (laktátdehydrogenáza), počet krevních destiček, velikost nádorů lymfomu a počet podstupených terapií. Celkově se medián přežití pohybuje od pěti do osmi měsíců (Bockorny *et al.*, 2021).

Důležitou roli hrají v případě Richterovy transformace chromozomové aberace. Mezi nejčastější cytogenetické abnormality patří delece genu *TP53*, delece genů *CDKN2A/B* a aberace genu *MYC*. V těchto případech dochází k inaktivaci funkce *p53* a aktivaci dráhy *MYC*, a jsou tedy významné v opravách poškození DNA, kontrole buněčného cyklu a proliferaci (Fabbri *et al.*, 2013). Často lze také pozorovat další chromozomové aberace. Až u 30 % případů se tato transformace vyskytuje společně s trizomií chromozomu 12 (Döhner *et al.*, 2000). Další velmi častou aberací spojovanou s Richterovým syndromem je mutace genu *NOTCH1* – až u 40 % pacientů (Rossi *et al.*, 2012). Dále byly popsány chromozomové změny oblastí 13q, 11q, 17p a 6q a trizomie chromozomu 12 (Döhner *et al.*, 2000). Předpokládá se, že většina těchto cytogenetických aberací, kromě aberace *TP53*, delece 13q14 a trizomie chromozomu 12, vzniká až v průběhu transformace (Khan *et al.*, 2018). Obecně je pro většinu pacientů ale charakteristický klonální vývoj a přítomnost komplexního karyotypu, který zahrnuje kombinace výše zmíněných chromozomových abnormalit.

### 3.2.2 Prognostické faktory

Chronická lymfocytární leukémie je choroba s velice variabilním průběhem. Někteří pacienti žijí běžným životem bez nutnosti léčby a umírají z příčin jiných, než je CLL, zatímco u jiných nemoc vyžadující léčbu velmi rychle progreduje a pacient umírá 2-3 roky od stanovení diagnózy (Wierda *et al.*, 2007). Na základě fyzikálního a laboratorního vyšetření lze identifikovat klinické stádium podle Raie, viz Tabulka 1, a Bineta. V Tabulce 2 jsou uvedena

kritéria pro jednotlivá stádia a jejich medián přežití (Rai *et al.*, 1975; Binet *et al.*, 1981, Pflug *et al.*, 2014). Obecně lze říct, že stádium koreluje s celkovým přežitím pacientů, avšak stále je každé stádium velmi variabilní, což omezuje predikci přežití pacienta. Kromě klinického stádia při léčbě CLL záleží i na fyzickém stavu pacienta včetně věku, pohlaví, stavu kostní dřeně a přítomnosti prolymfocytů v krvi a kostní dřeni.

Tabulka 1: Klinická stádia CLL podle Raie

Stádium	Příznaky	Medián přežití
0	lymfocytóza	> 10 let
1	lymfocytóza a lymfadenopatie	> 8 let
2	lymfocytóza a splenomegalie nebo hepatomegalie	
3	lymfocytóza a anémie	6,5 roku
4	lymfocytóza a trombocytopenie	

Tabulka 2: Klinická stádia CLL podle Bineta

Stádium	Příznaky	Medián přežití
A	méně než 3 postižené skupiny uzlin	> 10 let
B	3 a více postižených skupin uzlin	> 8 let
C	anémie	6,5 roku

Zásadní roli v průběhu onemocnění ale hrají již zmíněné genetické aberace, které jsou u CLL převážně nebalancované. Nejčastěji se jedná o delece dlouhého ramene chromozomu 13 (13q) a 11 (11q), krátkého ramene chromozomu 17 (17p) a trizomie chromozomu 12 (Nabhan *et al.*, 2015). Jak uvedl Döhner *et al.* již v roce 2000, více než 82 % pacientů má v genomu alespoň jednu chromozomovou abnormalitu. Tyto a další výsledky vedly ke vzniku klasifikace na základě fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), založené na přítomnosti delece 17p, 11q, 13q, trizomie 12 a normálního karyotypu. Nejhorší prognózu mají jednoznačně pacienti s delecemi 17p13.1 nebo 11q22.3 s dobou přežití 22 měsíců (Van Dyke *et al.*, 2016). Nemocní s delecí 17p jsou navíc často rezistentní k chemoimunoterapii a doba do progresu je u většiny cílených terapií

kratší (Hallek, 2019). Pacienti s trizomií 12 mají prognózu lepší s dobou přežití 30 měsíců (Van Dyke *et al.*, 2016). Skupiny s normální chromozomovou konstitucí a ty, které nesou delecí 13q, mají prognózu nejpříznivější, kdy přežívají v průměru 111, respektive 133 měsíců (Döhner *et al.*, 2000).

Jelikož je obecně přítomnost zvýšeného počtu cytogenetických abnormalit spojena s agresivnějším průběhem CLL, byl v poslední době definován další významný prognostický faktor tohoto onemocnění. Tím je komplexní karyotyp neboli přítomnost tří a více strukturálních nebo numerických chromozomových aberací identifikovaných pomocí tzv. pruhovacích technik (Baliakas *et al.*, 2019). I z tohoto důvodu jsou i přes stále se vyvíjející nové analýzy důležité techniky klasické cytogenetiky a stanovení karyotypu. Kromě změn uvedených v této práci existuje spousta dalších s více či méně známým dopadem na průběh onemocnění.

### **3.2.3 Molekulárně cytogenetické prognostické faktory**

Nejčastější chromozomovou aberací detekovanou pomocí FISH je delecce na dlouhém rameni chromozomu 13, konkrétně v oblasti 13q14 (Hallek, 2019). V tomto deletovaném regionu se nachází MDR (minimální deletovaná oblast), která obsahuje geny pro dvě miRNA, a to miR-15a a miR16-1, které mají tumor supresorovou funkci (Klein, *et al.*, 2010). miRNA však do delecce chromozomu 13 nejsou zahrnuty vždy a, i když je jejich exprese u některých pacientů snížena, nebyla nalezena souvislost s počtem deletovaných alel 13q. Proto by se kromě těchto miRNA na tumor supresorové aktivitě mohly podílet i další geny nacházející se v deletované oblasti chromozomu 13, jako např. *DLEU7* (Puiggros *et al.*, 2014). Tato abnormalita se vyskytuje u více než poloviny všech případů CLL, a přestože se u pacientů vyskytují rozdíly v průběhu onemocnění a míry přežití, je tato skupina považována za tu s velmi nízkým rizikem a dobrou prognózou (Klein, *et al.*, 2010).

Druhou nejčastější cytogenetickou abnormalitou je delecce dlouhého ramene chromozomu 11, která se nachází u přibližně 10–20 % pacientů trpících chronickou lymfocytární leukémií (Döhner *et al.*, 2000). Tato delecce často obsahuje oblast 11q22–23, kde se mimo jiných nachází gen *ATM*. Tento gen kóduje kinázu ATM důležitou pro opravy poškozené DNA, DNA rekombinaci a kontrolu buněčného cyklu. Dalším důležitým genem v této oblasti je *BIRC3*, což je negativní regulátor NF-κB proteinu, který funguje jako transkripční faktor. Klinicky je delecce 11q spojena s agresivnějším průběhem onemocnění, rozsáhlým postižením lymfatických uzlin, špatnou odpovědí na léčbu, a sníženou pravděpodobností přežití (Zenz *et al.*, 2010).

Nejdůležitější prediktivní faktor u onemocnění CLL je delece krátkého ramene chromozomu 17. Tato chromozomová aberace se nachází u 4 až 7 % pacientů (Zenz *et al.*, 2010). Tato delece téměř vždy zahrnuje oblast, kde se nachází tumor supresorový gen *TP53*. Produktem tohoto genu je protein p53, kterému se často přezdívá strážce genomu. Jedná se o transkripční faktor, jehož nejdůležitější úlohou je reakce na poškození DNA. Aktivace *TP53* vede v buňce k zástavě buněčného cyklu, opravě DNA, popř. apoptóze nebo senescenci (Hallek, 2019). Pacienti s CLL nesoucí deleci 17p jsou spojováni s velice špatnou prognózou a rychlým postupem onemocnění, kdy medián přežití je 3 až 5 let od diagnózy (Rossi *et al.*, 2013). Tato cytogenetická abnormalita také vykazuje výraznou rezistenci vůči genotoxickým chemoterapiím, i ve spojení s chemoimunoterapií.

Delece dlouhého ramene chromozomu 6 se u pacientů s CLL jako primární změna téměř nenachází. Vyskytuje se tedy s relativně nízkou frekvencí 3–6 %, většinou jako sekundární chromozomová aberace nebo v kontextu s komplexním karyotypem (Cuneo *et al.*, 2004). Pacienti s touto cytogenetickou změnou mají tedy obecně výrazně kratší dobu přežití a horší průběh onemocnění CLL. Nejčastěji v tomto případě dochází k deleci v oblasti 6q21. Které geny ale přispívají k patogenezi CLL zatím není známo (Krůzová *et al.*, 2020).

Poměrně vzácná je v případě CLL duplikace dlouhého ramene chromozomu 8, která se nachází u 2–5 % případů (Blanco *et al.*, 2014). Při duplikaci většinou dochází k amplifikaci oblasti 8q24, kde se nachází gen, jehož produktem je onkogenní transkripční faktor *MYC*. Ten hraje důležitou roli v progresi buněčného cyklu, apoptóze a buněčné transformaci. Kromě duplikace dochází také k přestavbám genu *MYC*, ty se ale u CLL vyskytují pouze výjimečně. Tyto chromozomové změny jsou spojeny s nepříznivou prognózou a progresí do Richterovy transformace.

Nejméně častou primární rekurentní změnou je translokace genu kódující těžký řetězec imunoglobulinů (*IGH*) vyskytující se asi u 4 % případů. Gen *IGH* se vyskytuje na dlouhém rameni chromozomu 14, konkrétně v oblasti 14q32. Stejně jako delece 6p se u pacientů postižených CLL vyskytuje velmi sporadicky, a to pouze v rámci klonálního vývoje onemocnění ((Döhner *et al.*, 2000). Obecně je tato abnormalita spojována s velmi špatnou prognózou, ale záleží na partnerském genu. Nejčastěji se jedná o translokace t(14;18)(q32;q21) s přestavbou genů *IGH/BCL2*, která se často vyskytuje společně s trizomií chromozomu 12 (Kojima *et al.*, 1998). Dále pak translokace t(14;19)(q32;q13) s přestavbou genů *IGH/BCL3* nebo t(8;14)(q24;q32) s přestavbou genů *IGH/MYC* (McCarthy *et al.*, 2008).

### 3.2.3.1 Trizomie chromozomu 12

Trizomie chromozomu 12 je třetí nejčastější chromozomová aberace, která je pozorována u 10 až 20 % pacientů s CLL, přičemž jako samostatná se může vyskytovat až u 70 % vzorků identifikovaných pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (Döhner *et al.*, 2000). Kromě toho může být asociována i s dalšími chromozomovými aberacemi, jako je delece oblastí 13q, 11q a 17q nebo i dalšími trizomiemi (Quijano *et al.*, 2008). Trizomie 12 byla původně podle prognostického modelu Döhnera považována za středně rizikovou aberaci, v dnešní době ale zůstává její prognostický význam předmětem debaty. Zatímco první studie zabývající se touto problematikou spojovaly trizomii chromozomu 12 s agresivnějším průběhem onemocnění, nedávné studie ji zařazují do kategorie s nízkým rizikem (Rossi *et al.*, 2013; Hallek, 2019).

Pacienti trpící CLL, u nichž se vyskytuje trizomie chromozomu 12, jsou velice heterogenní skupinou. U 40–60 % případů se mimo této změny nevyskytuje jiná chromozomová aberace (Krůzová *et al.*, 2020). Ve zbylých případech se spolu s trizomií 12 nejčastěji vyskytuje trizomie chromozomu 18 a 19, delece 14q, 13q, 11q nebo 17p a přestavby genu *IGH*. Tato chromozomová změna se také často vyskytuje na počátku vývoje CLL a usnadňuje vznik sekundárních chromozomových aberací nebo mutací v dalších genech např. genu *NOTCH1*. V poslední době byla zejména u pacientů s těžším průběhem CLL zjištěna vysoká frekvence mutací právě genu *NOTCH1*, dále nemutovaný stav genu *IGHV* a vysoké hladiny exprese znaků CD49d a CD38 (Balatti *et al.*, 2012; Autore *et al.*, 2018). Předpokládá se, že právě tyto mutace by mohly souviset se špatnou prognózou a být také důvodem rozdílnosti průběhu onemocnění a míry přežití pacientů s trizomií chromozomu 12.

Častý výskyt trizomie 12 u pacientů s kratší dobou do první léčby naznačuje, že do patogeneze jsou zapojeny geny umístěné na chromozomu 12 (Hu *et al.*, 2019). Jelikož je ale v tomto případě zasažen celý chromozom a ne jen jeho menší oblast, je obtížné určit, které geny by mohly být za patogenezi zodpovědné. Dle očekávání je trizomie 12 ve většině případů spojena s nadměrnou expresí genů vyskytujících po celém chromozomu 12, kromě toho ale může docházet i k nadměrné nebo nízké expresi genů mimo tento chromozom (Puiggros *et al.*, 2014).

### 3.2.3.2 Mutační stav *IGHV*

Jeden z nejvýznamnějších prognostických markerů u CLL je mutační status genu pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů (*IGHV*). Stanovení mutačního statusu genu *IGHV* umožňuje identifikovat leukemický klon B-buněk a současně rozděluje pacienty do dvou

prognosticky odlišných skupin. V roce 1999 Hamblin *et al.* definovali hranici, na základě které je stanoven mutovaný stav *IGHV* od nemutovaného. U pacientů s nemutovaným genem pro *IGHV* je nukleotidová homologie se zárodečnou linií větší než 98 %. Tito pacienti mají obecně horší prognózu s dobou přežití 3 roky až 10 let (Parikh *et al.*, 2016). Oproti tomu pacienti s mutovaným genem pro *IGHV* jsou spojováni s výrazně lepším průběhem CLL s mediánem přežití kolem 20 let (Parikh *et al.*, 2016). Mutační status *IGHV* u B-buněk většinou zůstává neměnný během celého onemocnění a jeho vyšetření není nutné opakovat.

### 3.2.4 Léčba

Na rozdíl od jiných typů leukémií nemusí být léčba CLL vždy zahájena ihned po stanovení diagnózy. Vzhledem k tomu, že se CLL vyvíjí často velice pomalu, mnoho nemocných léčbu nepotřebuje i několik let. Někteří pacienti dokonce nemusí léčbu podstoupit vůbec (Gribben *et O'Brien*, 2011). Léčba tak může zahrnovat pouze zmírnění klinických příznaků. U pacientů s nízkým nebo středním rizikem, kterých je u CLL přibližně 75 %, je medián doby do zahájení léčby 7 let. U pacientů s vysokým rizikem jsou to pak 2 roky (Burger, 2020).

Kritéria pro zahájení léčby jsou přesně definována (National Cancer Institute-Sponsored Working Group pro CLL), onemocnění musí být aktivní a splňovat určité podmínky, např. progredující lymfadenopatie, splenomegalie, zhoršení anémie, trombocytopenie atd. Konkrétní léčebný postup je zvolen na základě věku pacienta, komorbidit, mutace genu *TP53*, delece 17p nebo mutačního stavu genu *IGHV*. U pacientů s intaktním genem *TP53* a mutovaným genem *IGHV*, u kterých se v nejbližším horizontu neočekává progresa CLL, je vhodnou volbou chemoimunoterapie a chemoterapie. Po mnoho let je standardní léčbou režim FCR (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab), který má velmi dobré výsledky především v přežití pacientů. Pro pacienty s významnými komorbiditami a negativními prognostickými změnami jsou pak, z důvodu časté rezistence k FCR, ideálnější strategií léčby cílené perorální inhibitory signálních drah, např. BCR a Bcl-2. Zavedení léčiv jako je ibrutinib, idelalisib a venetoklax, znamenalo pro tuto skupinu pacientů, i přes negativní účinky, velký pokrok v léčbě včetně prodloužení doby přežití a snížení frekvence relapsů (Smolej *et al.*, 2021).

## 3.3 Cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody

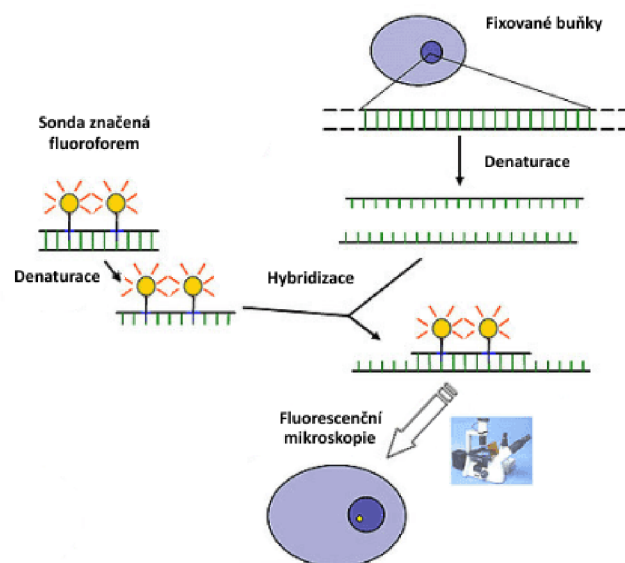
Jak již bylo uvedeno výše, důležitou úlohu v průběhu i léčbě chronické lymfocytární leukémie hrají chromozomové aberace. Od 70. let 20. století cytogenetici detekovali tyto abnormality převážně pomocí barvení chromozomů některou z tzv. pruhovacích technik, kdy byly



analyzovány jednotlivé pruhy na chromozomech. Za ideálních podmínek lze pomocí pruhování chromozomů detekovat i malé aberace o velikosti přibližně 5-10 megabází (Theisen, 2008). Kvůli nízké mitotické aktivitě byla ale dříve kultivace patologických B-lymfocytů problematická. Docházelo tak k velmi nízkému zachycení metafázních chromozomů a metody pruhování tak byly až v polovině případů neúspěšné. Výrazný pokrok nastal se zavedením stimulace B-lymfocytů kultivací s CpG oligonukleotidy a interleukinem-2. Ta umožnila vysoký záchyt metafázních chromozomů k následnému sestavení výsledného karyotypu (Dicker *et al.*, 2006). S vývojem nových technologií se vědci stále více obracejí k novějším a přesnějším molekulárně cytogenetickým technikám, které jsou zásadní pro diagnostiku a stanovení léčby onkologických pacientů.

### 3.3.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Jednou z nejrozšířenějších metod k identifikaci vybraných chromozomových abnormalit je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) (Mizuno *et al.*, 2019). Tato technika využívá fluorescenčně značené sondy k lokalizaci specifických sekvencí DNA na chromozomech pomocí fluorescenčního mikroskopu. Jak je možné vidět na Obrázku 3, každá sonda představuje



Obrázek 3: Schématické znázornění postupu fluorescenční *in situ* hybridizace (převzato a upraveno z Creative BioMart, 2021)

klonovaný úsek genomu konjugovaný s reportérovou molekulou, jakou je např. biotin, nebo přímo obsahuje fluorofor. FISH sondy jsou většinou izolovány v umělých chromozomech, ať už bakteriálních (BAC, bacterial artificial chromosome), nebo kvasinkových (YAC, yeast

artificial chromosome) (Mizuno *et al.* 2019). Sonda značená fluoroforem (např. Spectrum Orange, Spectrum Green a Spectrum Aqua) i DNA jsou denaturovány a následně dochází k hybridizaci komplementárních sekvencí DNA (O'Connor, 2008).

Existuje řada technik FISH, které se používají k diagnostice různých druhů chromozomových abnormalit, včetně delecí homozygotního nebo hemizygotního genu (Mizuno *et al.*, 2019). Na rozdíl od doby, kdy byla tato technika představena, je dnes možné kromě metafázních chromozomů analyzovat také chromozomy interfázní (Pinkel *et al.*, 1986). Tato skutečnost poskytuje velkou výhodu zejména při studiu chromozomových aberací solidních nádorů. U těchto typů nádorů bylo zachycení buněk ve stádiu mitózy velkým problémem, jelikož produkují velice malé množství dělicích se buněk. S využitím FISH a specifických genových a centromerických sond lze počet jednotlivých chromozomů a lokusů stanovit i v interfázních jádrech. Kromě toho je také možné použitím více druhů fluoroforů sledovat současně více míst chromozomu najednou (Trask, 2002).

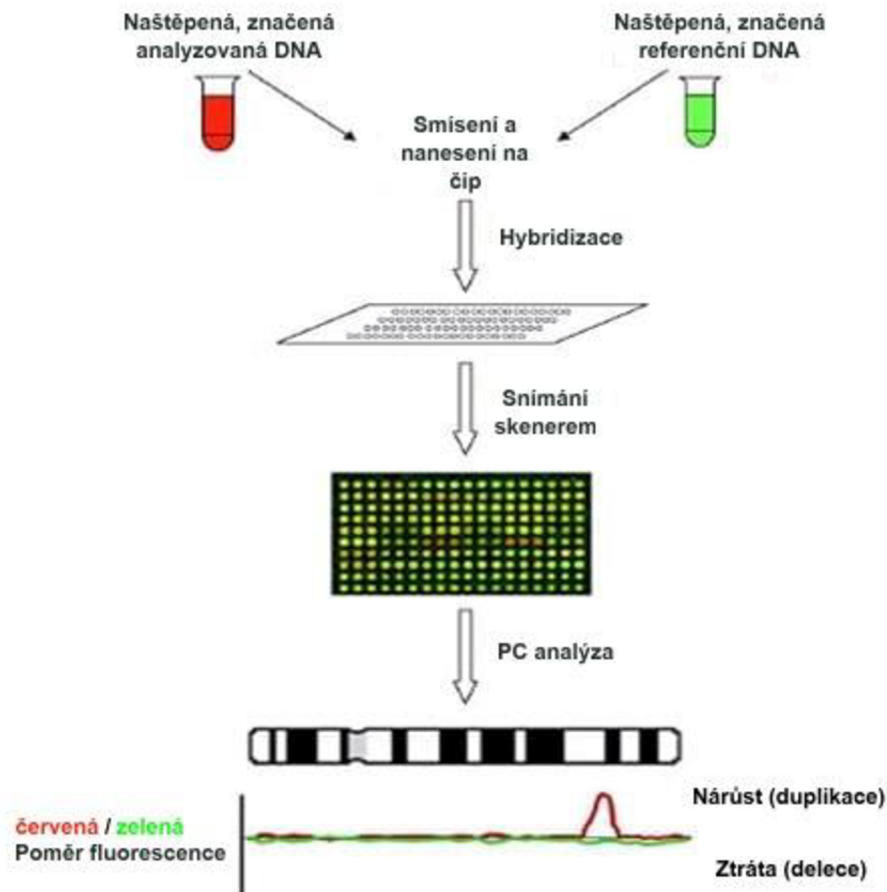
### **3.3.2 Array komparativní genomová hybridizace (aCGH)**

Další molekulárně cytogenetickou metodou je komparativní genomová hybridizace (CGH), původně vyvinuta k detekci změn počtu kopií chromozomů u solidních nádorů (Kallioniemi *et al.*, 1992). Metoda CGH využívá dva vzorky DNA, které jsou značeny odlišnými fluorofory. Prvním vzorkem je DNA odebraná z vyšetřované tkáně, druhým je pak referenční neboli kontrolní DNA. Takto připravené sondy jsou poté hybridizovány s metafázními chromozomy. Intenzita fluorescenčního signálu je snímána fluorescenčním mikroskopem a dochází k porovnání vyšetřované DNA s DNA referenční, což umožňuje identifikaci změn v počtu kopií (Kočárek *et al.*, 2006).

Obměnou CGH je potom metoda array komparativní genomové hybridizace (aCGH) kombinující princip CGH s použitím mikroarrayí. Tato technika místo metafázních chromozomů využívá sklička s malými segmenty DNA, tzv. čipy. Čip se vyrábí navázáním úseku DNA tzv. sond na pevný nosič, kterým je v nejčastějším případě právě skličko velikostí podobné skličku podložnímu (Kočárek *et al.*, 2006). Čip může obsahovat jak nasyntetizované sondy o velikosti 25-85 párů bází vybrané podle oblastí genomu, které chceme sledovat, tak i sondy o velikosti i např. bakteriálních umělých chromozomů (Theisen, 2008). Průběh analýzy je ale ve všech případech stejný. DNA je nejdříve vyizolována z odebrané tkáně, kterou může být např. periferní krev nebo kostní dřev. Analyzovaná a referenční DNA je štěpena za tvorby DNA fragmentů a obě DNA jsou označeny fluorescenčním barvivem příslušné barvy, jak lze

vidět na Obrázku 4. Obě fragmentované fluorescenčně značené molekuly DNA se poté smísí a nanesou na čip, kde jsou hybridizovány s navázanými jednořetězcovými sondami. Výsledky hybridizace jsou snímány speciálním skenerem a hodnoceny pomocí počítačového softwaru. Ten změří poměr fluorescence obou fluoroforů podél celého genomu, z čehož je možné stanovit relativní počet kopií sekvencí v testovaném genomu ve srovnání s normálním genomem (Agilent, 2021).

Hlavní výhodou této metody je schopnost současně detekovat kvantitativní změny napříč celým genomem: aneuploidie, delece, duplikace nebo amplifikace jakéhokoli lokusu obsaženého na čipu. Technika aCGH se také osvědčila jako účinný nástroj pro detekci submikroskopických chromozomových abnormalit souvisejících např. právě s CLL, ale i jinými onemocněními.



Obrázek 4: Schématické znázornění postupu array komparativní genomové hybridizace (převzato a upraveno z Creative Bioarray, 2021)

Protože sondy jsou o několik řádů menší než metafázní chromozomy, je teoretické rozlišení aCGH v porovnání s původní CGH mnohonásobně vyšší (Theisen, 2008). Zároveň je rozlišení

omezeno pouze velikostí DNA fragmentů a vzdáleností mezi sekvencemi DNA na čipu. V porovnání s metodou FISH je zde velká výhoda v detekci změn DNA na velkém množství lokusů najednou (Bejjani *et Shaffer*, 2006). Významnou nevýhodou ovšem zůstává finanční náročnost, kdy velmi drahé jsou jak samotné čipy, tak i vyhodnocování zařízení (Kočárek *et al.*, 2006).

## **4 MATERIÁL A METODY**

### **4.1 Biologický materiál**

K experimentům byla použita DNA pacientů s chronickou lymfocytární leukémií, kteří byli léčeni na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci (HOK FN Olomouc) v letech 1982-2021. DNA byla izolována metodou fenol-chloroformové extrakce nebo automaticky za pomoci izolátorů nukleových kyselin MagNA Pure Compact (Roche) a QIAcube Connect (QIAGEN) v Laboratoři molekulární biologie HOK FN Olomouc. Biologickým materiálem používaným pro izolaci DNA byla nejčastěji periferní krev, v méně častých případech kostní dřeň nebo lymfatické uzliny.

### **4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky**

#### **4.2.1 Použité chemikálie**

- 1x TE pufr (Promega Corporation, kat. č. V6231)
- Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 (Agilent Technologies, kat. č. 5188-5221)
- Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2 (Agilent Technologies, kat. č. 5188-5222)
- Cot-1 Human DNA (Agilent Technologies, kat. č. 5190-3392)
- Human Reference DNA Female (Agilent Technologies, kat. č. 5190-3797)
- Human Reference DNA Male (Agilent Technologies, kat. č. 5190-3796)
- ultračistá DNase-free voda

#### **4.2.2 Použité soupravy**

- Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kit (Agilent Technologies, kat. č. 5188-5220)
- Qubit<sup>TM</sup> dsDNA BR Assay Kit (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, kat. č. Q32850)
- SureTag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies, kat. č. 5190-3399)

### **4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

- Centrifuga 5424 (Eppendorf)
- Centrifuga s vortexem FVL-2400N (Biosan)
- Fluorimetr Quibit 2.0 (Invitrogen)

- Minicentrifuga MiniStar silverline (VWR)
- Pec hybridizační 1013 (Shel Lab)
- SureScan Microarray skener (Agilent Technologies)
- Termocykler ProFlex PCR systém (Thermo Fisher)
- Termostat blokový Bio TDB-100 (Biosan)
- Třepačka Termomixer comfort (Eppendorf)
- Vodní lázeň 1002 (GFL)

## 4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.4.1 Metodický postup aCGH

#### 4.4.1.1 Stanovení koncentrace DNA ve vzorku pomocí Qubit™ Assays

Laboratoří molekulární biologie HOK byla provedena izolace DNA všech pacientů. Zředěním Qubit™ reagentu Qubit™ dsDNA BR puřem v poměru 1 : 200 byl připraven pracovní roztok. Ke 198  $\mu$ l pracovního roztoku byly přidány 2  $\mu$ l DNA vzorku pacientů. Vzorky byly krátce zvortexovány a zcentrifugovány a jejich koncentrace DNA byla stanovena fluorimetricky pomocí Qubit.

#### 4.4.1.2 Štěpení genomové DNA (gDNA)

Na základě hodnoty koncentrace z fluorimetru byly vzorky ve 200 $\mu$ l zkumavce naředěny ultračistou vodou (DNAse free) na výslednou koncentraci 700 ng DNA a konečný objem 20,2  $\mu$ l. Vzorky byly následně krátce zcentrifugovány a zvortexovány. Poté byl připraven štěpící Master Mix pro 4čipovou microarray dle Tabulky 3.

Tabulka 3: Složení štěpícího Master Mixu pro 4čipovou mikroarray

Položka	Objem na 1 vzorek [ $\mu$ l]	Objem na 4 vzorky [ $\mu$ l]
Ultračistá voda (DNAse free)	2,0	17,00
10x Restriction Enzyme Buffer	2,6	22,10
BSA	0,2	1,70
Alu I	0,5	4,25
RSA I	0,5	4,25
konečný objem	5,8	49,30

Do každé zkumavky obsahující genomovou DNA bylo přidáno 5,8  $\mu\text{l}$  štěpicího Master Mixu a obsah byl lehce promíchán na vortexu. Zkumavky se vzorky byly přesunuty do termocyklu, kde proběhla reakce podle parametrů uvedených v tabulce 4.

Tabulka 4: Reakční podmínky pro restriční štěpení

Krok	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [min]
1	37	120
2	65	20
3	4	$\infty$

#### 4.4.1.3 Značení naštěpené DNA

Během značení byly veškeré chemikálie uchovávány na ledu. Po restričním štěpení bylo do každé zkumavky s reakční směsí přidáno 5  $\mu\text{l}$  random primeru. Každá směs byla krátce zcentrifugována a zvortexována a následně na 3 min přenesena do termobloku vytemperovaného na 98  $^{\circ}\text{C}$ . Zkumavky byly přesunuty na led a inkubovány 5 min. Poté byla směs centrifugována 1 min při 6 000 g. Mezitím byl podle Tabulky 5 jednou připraven cyanine 3-dUTP značící Master Mix a jednou cyanine 5-dUTP značící Master Mix pro 4čipovou mikroarray.

Tabulka 5: Složení značícího Master Mixu pro 4čipovou mikroarray

Položka	Objem na 1 vzorek [ $\mu\text{l}$ ]	Objem na 4 vzorky [ $\mu\text{l}$ ]
5x Reaction Buffer	10	42,50
10x dNTPs	5	21,25
Cyanine 3-dUTP nebo Cyanine 5-dUTP	3	12,75
Exo Klenow fragment	1	4,25
konečný objem	19	80,75

Do každé zkumavky bylo napipetováno 19  $\mu\text{l}$  značícího Master Mixu. Obsah zkumavky byl krátce zcentrifugován a zvortexován. Zkumavky byly přeneseny do termocyklieru kde proběhla reakce podle parametrů uvedených v tabulce 6.

Tabulka 6: Reakční podmínky pro značení DNA

Krok	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [min]
1	37	120
2	65	10
3	4	$\infty$

#### 4.4.1.4 Přečištění značené gDNA

Značená gDNA byla centrifugována 1 min při 6 000 g. Každý vzorek s gDNA byl v mikrozkuhavce smíchán s 430  $\mu\text{l}$  1x TE pufru a směs byla následně přenesena na filtr purifikační kolonky umístěné ve sběrné 2ml zkumavce. Mikrozkuhavka s purifikační kolonkou byla centrifugována 10 min při 14 000 g. Supernatant byl slit a na purifikační kolonku bylo napipetováno 480  $\mu\text{l}$  1x TE pufru. Mikrozkuhavka s purifikační kolonkou byla opět centrifugována 10 min při 14 000 g. Purifikační kolonka byla po otočení vložena do nové sběrné mikrozkuhavky a centrifugována 1 min při 1 000 g. Supernatant byl slit. Následně byla pomocí Nanodropu 8000 změřena koncentrace a značení vzorků, na základě kterých byla dále vypočítaná specifická aktivita:

$$\text{Specifická aktivita kontroly} = \frac{Cy\ 3\ [pmol \cdot \mu l^{-1}]}{c\ [ng \cdot \mu l^{-1}]} \cdot 1\ 000$$

$$\text{Specifická aktivita vzorku} = \frac{Cy\ 5\ [pmol \cdot \mu l^{-1}]}{c\ [ng \cdot \mu l^{-1}]} \cdot 1\ 000$$

Aby byly splněny podmínky očekávaných výtěžků musela být specifická aktivita kontroly v rozmezí 25–40 a specifická aktivita vzorku 20–35. Ke vzorkům značené gDNA pacientů bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  značené referenční DNA, přičemž vždy byla mužská referenční DNA přidána ke gDNA mužského pacienta a ženská referenční DNA ke gDNA ženského pacienta. S použitím pipety byl obsah promíchán. Pomocí chemikálií uvedených v Tabulce 7 byl připraven hybridizační Master Mix, přičemž 10 x Blocking Agent byl připraven naředěním



lyofilizovaného 10 x aCGH Blocking Agent 1,350  $\mu$ l destilované vody. Ke každému ze čtyř vzorků bylo přidáno 71  $\mu$ l hybridizačního Master Mixu do výsledného objemu 110  $\mu$ l. Směs byla krátce zcentrifugována. Připravené sondy byly 3 min inkubovány v termobloku při 98 °C. Mikrozkumavky se zdenaturovanými sondami byly přeneseny do vodní lázně, kde byly 30 min inkubovány při 37 °C.

Tabulka 7: Složení hybridizačního Master Mixu pro 4čipovou mikroarray

<b>Položka</b>	<b>Objem na 1 vzorek [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Objem na 4 vzorky [<math>\mu</math>l]</b>
Cot-1 DNA	5	25
10x Blocking Agent	11	55
2x HI-RPM Hybridization Buffer	55	275
konečný objem	71	355

Po vytažení z vodní lázně byly mikrozkumavky centrifugovány 1 min při 1 000 g. Na hybridizační sklíčko umístěné v hybridizační komůrce bylo nanášeno 100  $\mu$ l každé připravené sondy. Hybridizační komůrka byla zkompletována a přenesena do hybridizační pece předehřáté na 67 °C. Hybridizace probíhala 24 h při 20 rpm při 67 °C.

#### **4.4.1.5 Posthybridizační mytí mikroarraye**

Následující den byly pro odmývání mikroarraye použity komerčně dodávané odmývací roztoky č. 1 a 2 ve třech odmývacích vaničkách. Dvě z nich byly naplněny odmývacím roztokem č. 1 o pokojové teplotě a do třetí vaničky byl nalit odmývací roztok č. 2 o teplotě 37 °C. Hybridizační komůrka byla vytažena z pece, otevřena a čip s krycím sklem byl přenesen do první vaničky s roztokem. Pod hladinou byl čip oddělen od krycího skla a následně byl přenesen do druhé vaničky umístěné na magnetickém míchadle. Čip byl ve druhé vaničce spolu s magnetickým míchadlem inkubován 5 min. Po přenosu do třetí vaničky taktéž umístěné na magnetickém míchadle byl čip s magnetickým míchadlem inkubován 1 min. Čip byl pomalu vytažen ze třetí odmývací vaničky a následně skenován pomocí SureScan microarray scanneru. Vyhodnocení výsledného souboru ve formátu .tif se provádělo v programu CytoGenomics 4.0.2, výsledky byly zapsány podle aktuální verze Mezinárodního systému pro cytogenetickou nomenklaturu (ISCN 2020).

#### **4.4.2 Statistická analýza**

Statistickou analýzu dat provedl RNDr. Tomáš Fůrst, Ph.D. Pro zjištění rozdílů ve spojitých proměnných mezi jednotlivými skupinami byl použit Kruskalův–Wallisův test. Pro zjištění rozdílů mezi diskrétními proměnnými byl použit chí-kvadrát test v kontingenční tabulce.

## 5 VÝSLEDKY

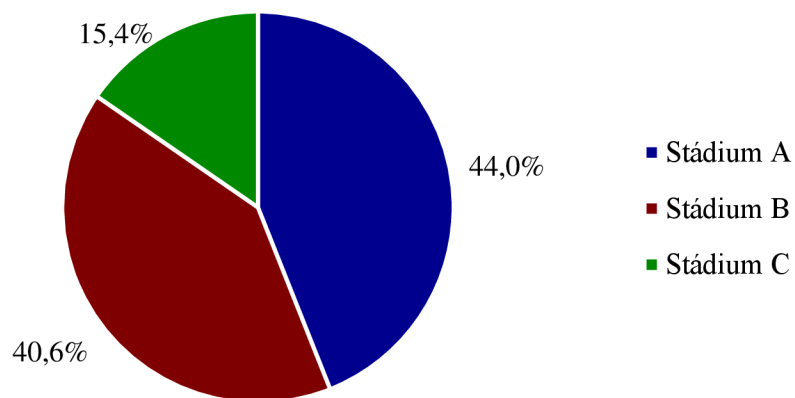
### 5.1 Soubor pacientů

Soubor tvořilo celkem 134 pacientů s diagnostikovaným onemocněním CLL, kteří měli trizomii chromozomu 12 prokázanou pomocí FISH nebo cytogeneticky. Tito pacienti tvořili 11,9 % z celkového počtu 1 123 pacientů léčených s CLL.

Soubor tvořilo 60 (44,8 %) žen a 74 (55,2 %) mužů. Medián věku, kdy byla pacientům stanovena diagnóza byl 67 let, s rozmezím 35–88 let. V klinickém stadiu A, při rozdělení dle Bineta (Binet *et al.*, 1981), bylo 40 pacientů (44,0 %), 37 pacientů ve stadiu B (40,6 %) a ve stadiu C 14 pacientů (15,4 %). Jejich poměr lze vidět na Obrázku 5. U 43 pacientů nebylo klinické stadium nemoci podle Bineta stanoveno.

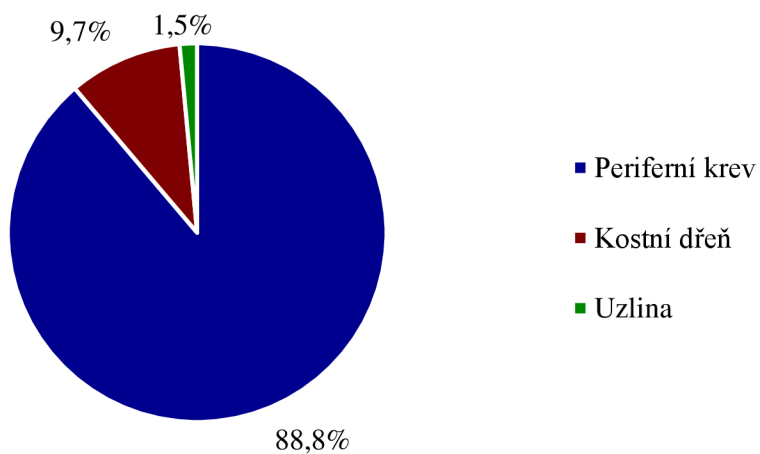
Tabulka 8: Základní údaje o souboru pacientů s trizomií 12

Medián věku při stanovení diagnózy	67	
Nejnižší věk při stanovení diagnózy	35	
Nejvyšší věk při stanovení diagnózy	88	
Počet pacientů	134	
Počet žen	60	44,8 %
Počet mužů	74	55,2 %
Počet pacientů se stadiem A	40	44,0 %
Počet pacientů se stadiem B	37	40,6 %
Počet pacientů se stadiem C	14	15,4 %



Obrázek 5: Poměr pacientů s trizomií 12 s klinickými stádii podle Bineta

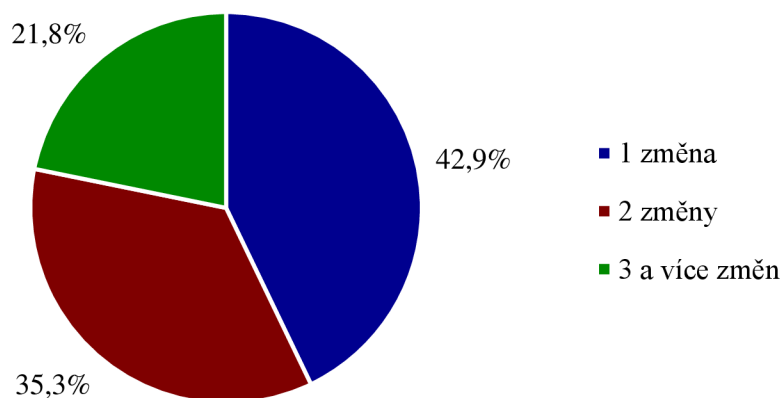
Nejčastěji vyšetřovaným materiálem byla u 119 pacientů (88,8 %) periferní krev. U 13 pacientů (9,7 %) byla vyšetřovaným materiálem kostní dřeň a u 2 pacientů (1,5 %) uzlina, viz Obrázek 6.



Obrázek 6: Poměr vyšetřovaného materiálu pacientů s trizomií 12

## 5.2 Cytogenetické a molekulárně cytogenetické výsledky

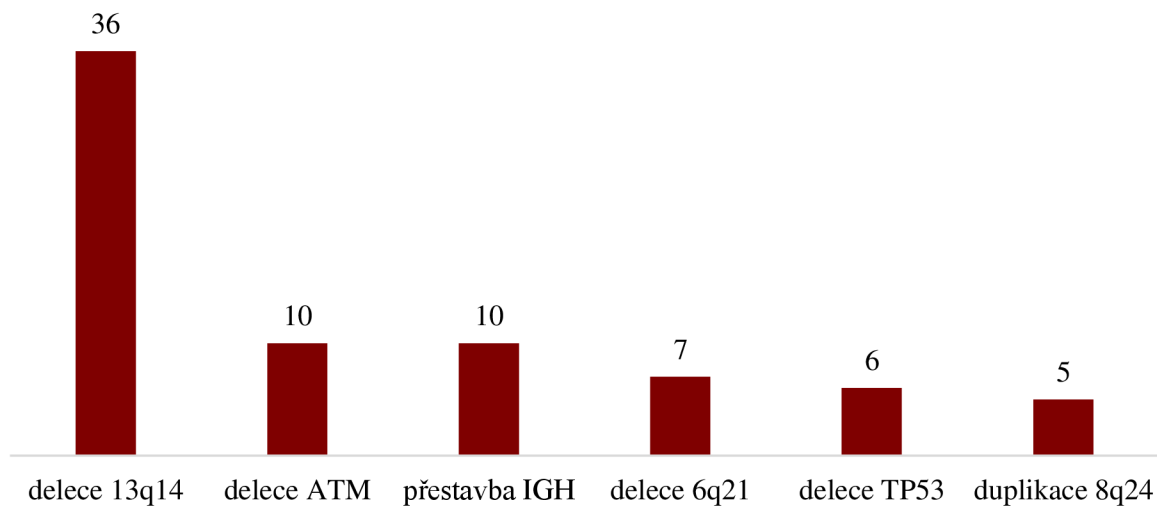
Klasické cytogenetické vyšetření bylo úspěšně provedeno u 74 pacientů (55 %), z toho u 66 pacientů (49 %) byly detekovány chromozomové aberace. U 29 pacientů (21,8 %) stanoven komplexní karyotyp, což znamená tři a více chromozomových změn v karyotypu. Sto čtyři pacienti (78,2 %) měli karyotyp bez komplexních změn. U 1 pacienta nebylo možné komplexní změny v karyotypu stanovit. Jednu cytogenetickou aberaci, tedy pouze trizomii 12 jako solo změnu, vykazovalo 57 pacientů (42,9 %) a 47 pacientů (35,3 %) mělo chromozomální změny dvě, viz Obrázek 7.



Obrázek 7: Poměr zastoupení počtu chromosomálních změn u souboru pacientů s trizomií 12 vyšetřovaných metodou FISH

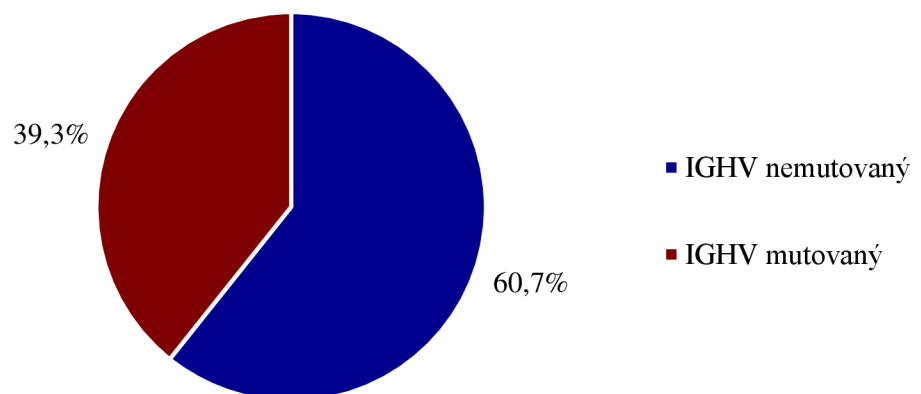
U všech pacientů byla provedena metoda FISH k detekci trizomie chromozomu 12, delece genů *ATM* a *TP53*, oblastí 13q14 a 6q21, duplikace oblasti 8q24 a přestavby genu *IGH*. Nejčastější pozorovanou cytogenetickou změnou podle výsledků FISH byla u souboru pacientů s trizomií 12 delece 13q14 vyskytující se u 36 pacientů (27 %). Spolu s touto delecí se u 16 pacientů (12 %) vyskytovala i jiná chromozomová změna. Další nejčastěji vyskytující se změnou byla delece genu *ATM*, konkrétně se jednalo o 10 pacientů (7,5 %). Jen jeden z nich neměl při této delecí žádnou další pozorovanou změnu. Stejný počet pacientů mělo ve svém genomu přestavbu genu *IGH*, která celkem ve 4 případech nebyla jedinou chromozomovou aberací. Nejčastěji se jednalo o t(14;18) s přestavbou genů *IGH/BCL2* a t(14;19) s přestavbou genů *IGH/BCL3*. Pacientů s deletovanou oblastí 6q21 společně s trizomií 12 bylo 7 (5 %). Pouze u 2 pacientů se tento deletovaný gen vyskytoval samostatně. Delecí genu *TP53* vykazovalo celkem 6 pacientů (4,5 %) s trizomií 12. Pouze u 1 pacienta byla tato cytogenetická aberace jako jediná. U této

skupiny pacientů byl nejčastěji pozorován klonální vývoj do komplexního karyotypu, který se celkem vyskytoval u 11 pacientů (8,2 %). Nejméně zastoupenou cytogenetickou změnou byla duplikace 8q24, viz Obrázek 8. Tuto duplikaci mělo pouze 5 pacientů (4 %) s trizomií 12, přičemž u 4 z nich se vyskytovala ještě jiná chromozomová aberace.



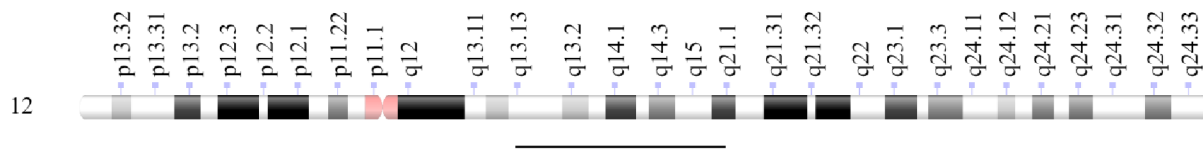
Obrázek 8: Poměr četnosti zastoupení všech cytogenetických aberací u souboru pacientů s trizomií 12 vyšetřovaných metodou FISH

Vyšetřením metodami molekulární biologie, které provedla Laboratoř molekulární biologie HOK, byl zjištěn mutační stav genu *IGHV*. U 68 pacientů (60,7 %) se mutace tohoto genu nevyskytovala (*IGHV* nemutovaný). Naopak ve 44 případech (39,9 %) gen *IGHV* mutován byl, viz Obrázek 10. U 22 pacientů nebyl stav genu *IGHV* stanoven.



Obrázek 10: Poměr pacientů s trizomií 12 s mutovaným a nemutovaným genem *IGHV*

U celkem 70 pacientů s trizomií 12 bylo provedeno vyšetření metodou aCGH. Z tohoto souboru pacientů byla u 60 (86 %) pacientů trizomie 12 potvrzena. Deset pacientů (14 %) mělo nižší zastoupení patologických buněk, které bylo pod detekčním limitem metody. U 58 pacientů se jednalo o zmnožení celého chromozomu 12. U dvou pacientů s nálezem trizomie 12 v aCGH byla v cytogenetickém vyšetření prokázána přítomnost jedné kopie chromozomu 12 a dále izochromozomů z dlouhých a krátkých ramen chromozomu 12: i(12)(q10), i(12)(p10). U dvou dalších pacientů byla zachycena tzv. parciální trizomie 12, kdy došlo k duplikacím části dlouhých ramen chromozomu 12. Rozsah těchto duplikací je znázorněn na Obrázku 9.

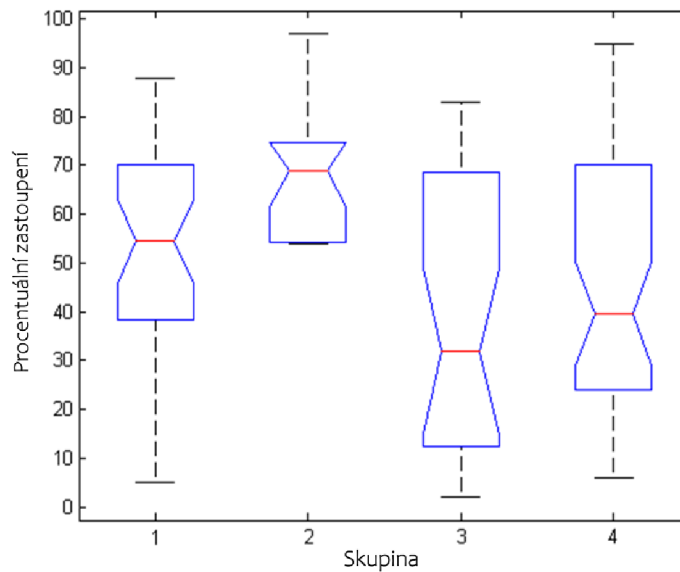


Obrázek 9: Rozsah parciálních trizomií na chromozomu 12

Metodou aCGH bylo napříč souborem pacientů s trizomií 12 detekováno dalších 31 aberací, které nebyly zachyceny za pomoci G-pruhování a FISH. Nejčastěji byly zachyceny trizomie dalších chromozomů, zejména se jednalo o chromozomy 18 a 19. Dále byly u 7 pacientů zjištěny intersticiální delecce dlouhých ramen chromozomu 14 s rozsahem od 14q23.3 do 14q32.33.

### 5.3 Statistické vyhodnocení dat

Pro účely statistické analýzy byli pacienti rozděleni do 4 skupin: 1. pacienti, kteří zemřeli do 5 let od diagnózy; 2. pacienti, kteří zemřeli po více než 5 letech od diagnózy; 3. žijící pacienti s dobou sledování kratší než 5 let od diagnózy; 4. žijící pacienti s dobou sledování delší než 5 let od diagnózy. U těchto skupin pacientů bylo sledováno procentuální zastoupení trizomie chromozomu 12 v odebraném materiálu, viz Obrázek 11.

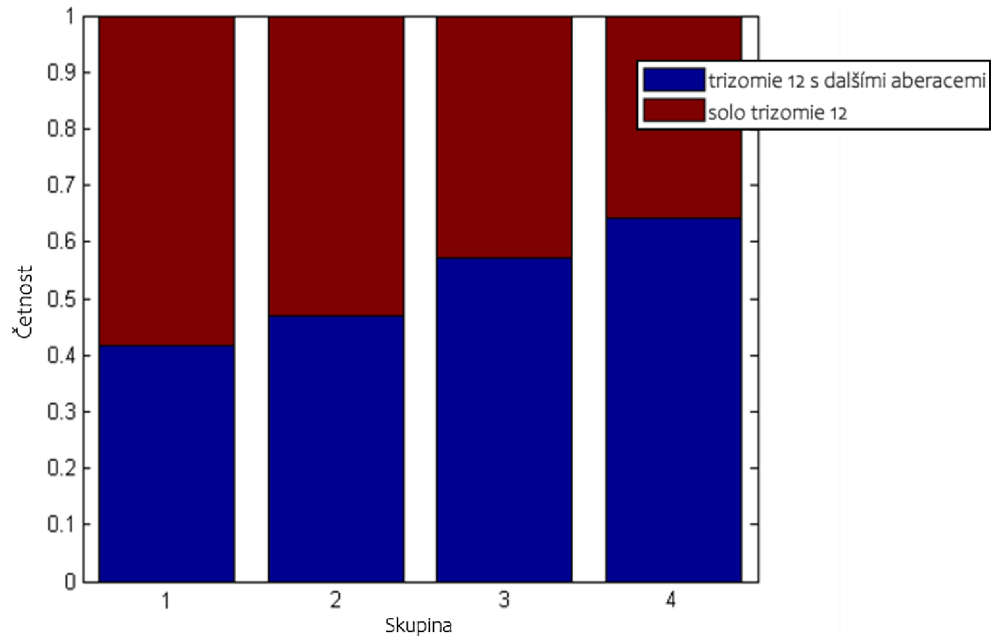


Obrázek 11: Procentuální zastoupení trizomie chromozomu 12 v jednotlivých skupinách stanovené pomocí Kruskalova–Wallisova testu

Byla prokázána asociace úmrtí s vysokým zastoupením trizomie 12 v odebraném materiálu ( $p = 0,03$ ), což odpovídá vyššímu procentuálnímu zastoupení patologických klonů. Procentuální zastoupení trizomie 12 zároveň nesouvisí s pohlavím, věkem při stanovení diagnózy ani časem do nasazení léčby.



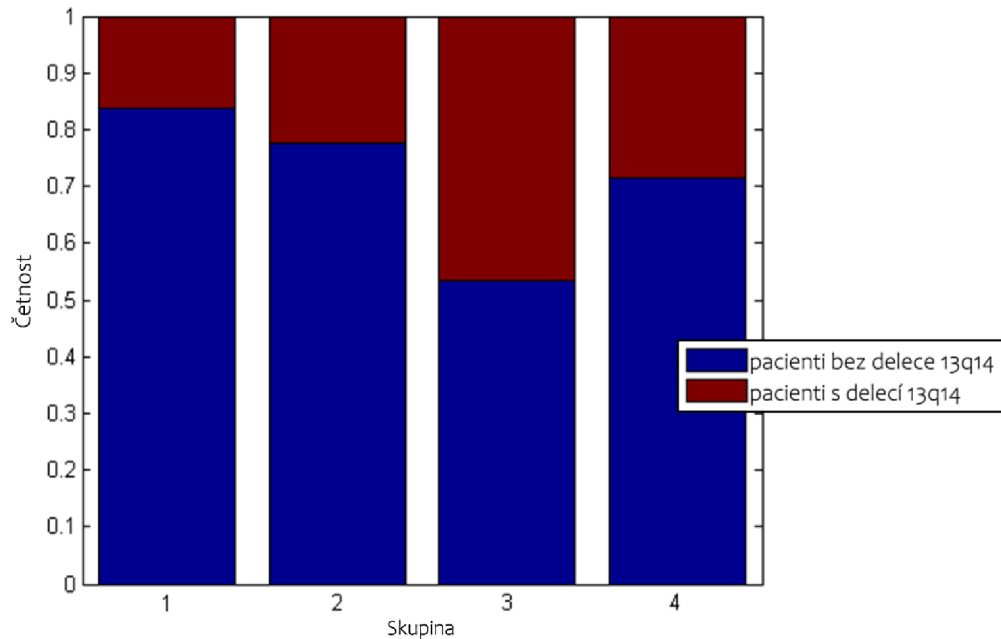
Bylo zjištěno, že se trizomie chromozomu 12 jako solo změna vyskytuje častěji u starších pacientů, medián jejich věku byl 70 let. Pacienti s dalšími aberacemi byli mladší s mediánem věku 65 let, viz Obrázek 12. Tento efekt je statisticky významný ( $p = 0,02$ ).



Obrázek 12: Zastoupení solo trizomie chromozomu 12 oproti trizomii chromozomu 12 vyskytující se současně s dalšími změnami v jednotlivých skupinách stanovené pomocí chí-kvadrát testu

Oproti očekávání je pozorován trend napříč všemi skupinami pacientů, kdy je solo trizomie chromozomu 12 spojena s horším průběhem onemocnění. V první skupině (pacienti, kteří zemřeli do 5 let od diagnózy) je podíl solo trizomie chromozomu 12 60 %, zatímco ve skupině č. 4 (žijící pacienti s dobou sledování delší než 5 let od diagnózy) podíl činí 40 %. Výskyt solo trizomie 12 však nemá statisticky prokázaný vliv na dobu do zahájení první léčby.

Nejčastější další změnou k trizomii 12 byla delece 13q14 detekovaná u celkem 36 pacientů. V této skupině jsou častěji zastoupeny ženy než muži (21 : 15), naopak ve skupině pacientů bez delece 13q14 se častěji vyskytují muži než ženy (57 : 34) ( $p = 0,04$ ). Doba do zahájení léčby však na přítomnosti delece 13q14 nezávisí. Nejvíce byla tato změna pozorována ve skupině 1 (pacienti, kteří zemřeli do 5 let od diagnózy) ( $p = 0,05$ ), viz Obrázek 13.



Obrázek 13: Zastoupení pacientů s delecí 13q14 oproti pacientům bez delece 13q14 v jednotlivých skupinách stanovené pomocí chí-kvadrát testu

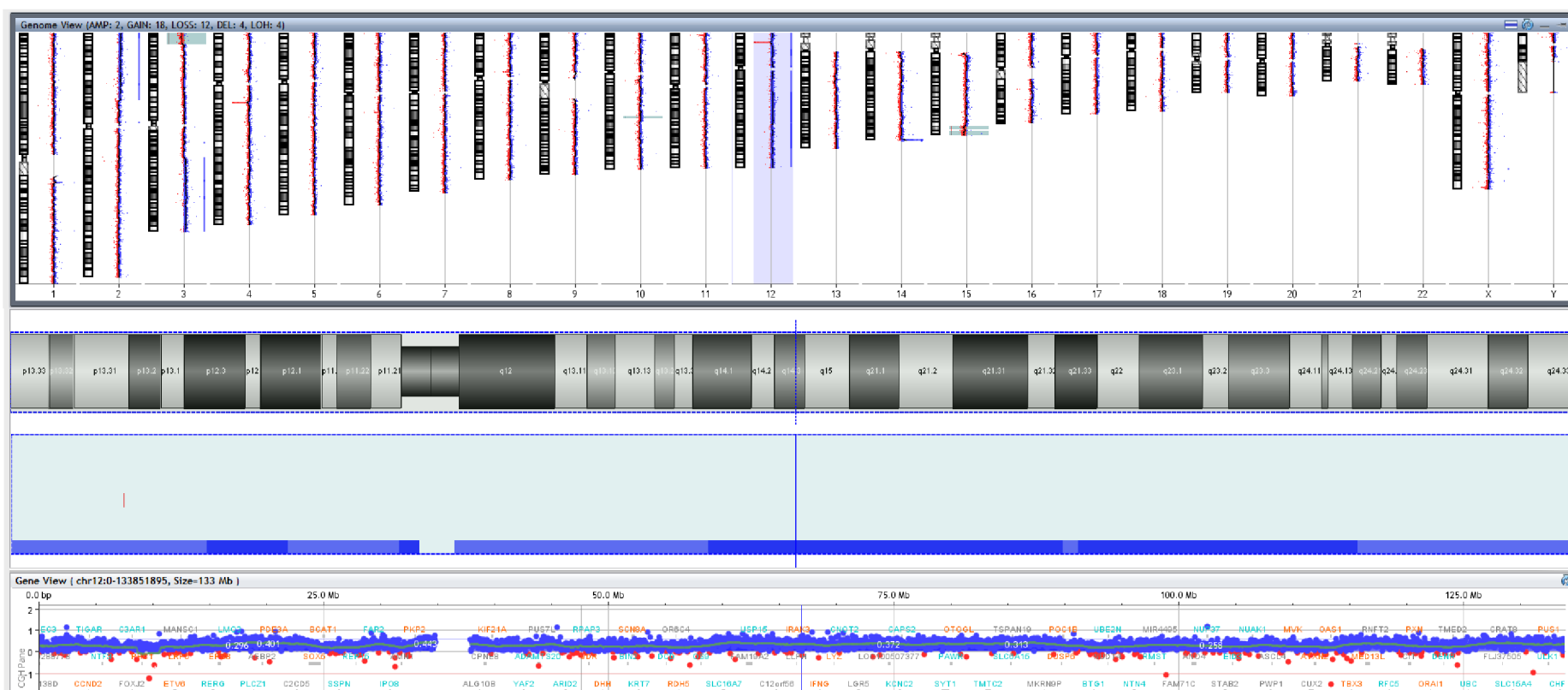
Zastoupení všech ostatních pozorovaných změn bylo nižší, a proto nebylo možné statisticky hodnotit jejich vliv na průběh onemocnění. Například u 6 nemocných s delecí 17p13 byla pozorována kratší doba do léčby (medián věku byl 0,2 roku) oproti pacientům bez delece 17p13 (medián věku byl 1,1 roku). Byla pozorována závislost počtu chromozomových aberací na době zahájení léčby. Čím více chromozomových aberací se u pacientů vyskytovalo, tím dříve byla léčba nasazena. Výsledky ale nejsou pro velký rozptyl v jednotlivých skupinách statisticky významné.

U pacientů s mutovaným stavem genu *IGHV* byla prokázána více než dvojnásobná doba do zahájení léčby oproti pacientům s nemutovaným stavem *IGHV*. Bohužel vzhledem k velkému rozptylu dat ale nebyl statistický význam mutačního stavu *IGHV* prokázán.

## 5.4 Příklady výsledků aCGH u vybraných pacientů

### Výsledek aCGH u pacienta 12

Pacient č.12 je muž, rok narození 1961. CLL mu byla diagnostikována v roce 2005 (44 let), přičemž léčba u něj byla zahájena až v roce 2016, po 11 letech sledování. V této době byl pacient vyšetřen metodou aCGH, viz Obrázek 14.



Obrázek 14: Výsledek aCGH u pacienta 12 s trizomií chromozomu 12

Na obrázku je výsledek hybridizace s použitím aCGH čipu 4x180 K (Agilent). Profily chromozomů jsou seřazeny od 1 po 22 a gonozomy X, Y zleva doprava. Podél chromozomu je zobrazen poměr intenzit signálu Cy3/Cy5. Zmnožení materiálu je znázorněno modře z pravé strany podél profilu chromozomu a ztráty materiálu jsou označeny červeně z levé strany chromozomu. Podrobně je zobrazen chromozom 12, u kterého byla pozorována trizomie. Kromě této změny bylo prokázáno zmnožení části chromozomu 2 v oblasti 2p25.3–2p14 o velikosti 67 333 975 bp. Na chromozomu 3 se na krátkém rameni vyskytuje ztráta genetické informace a na dlouhém rameni došlo opět ke zmnožení. Ke ztrátě části genetického materiálu došlo i na chromozomu 15 v oblasti 15q26.1–15q26.3 o velikosti 9 240 460 bp.

Kombinací metod G-pruhování, FISH a aCGH byl stanoven výsledný komplexní karyotyp:

47,XY,der(3)dup(3)(q21.2q29)t(3;3)(q21.2;p25.3)del(3)(p26.3p25.3),der(15)t(2;15)(p14;q26.1),t(18;22)(q21;q11),+12 [25]

47,XY,der(3)dup(3)(q21.2q29)t(3;3)(q21.2;p25.3)del(3)(p26.3p25.3),del(13)(q14),der(15)t(2;15)(p14;q26.1),t(18;22)(q21;q11),der(21)t(13;21)(q?21;p?11.2),+12 [4]

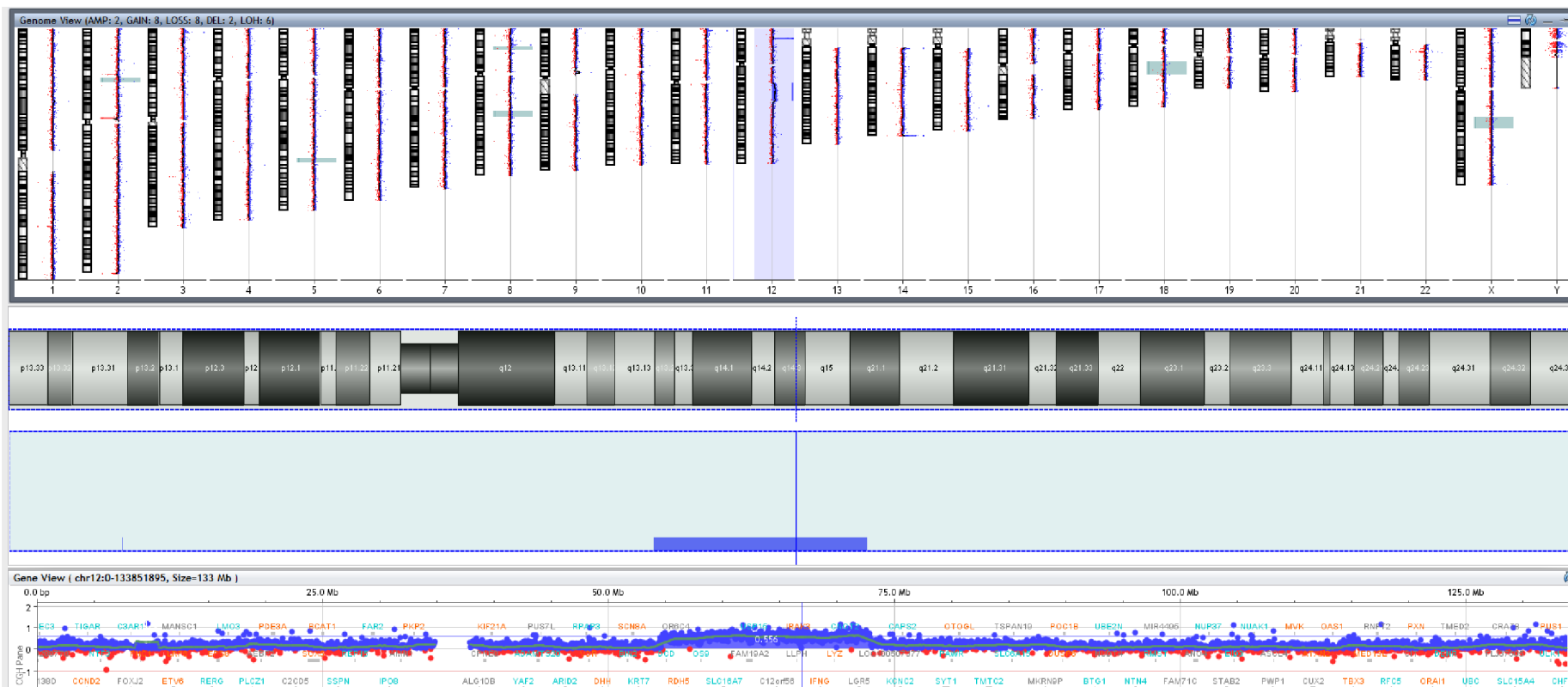
47,XY,der(3)dup(3)(q21.2q29)t(3;3)(q21.2;p25.3)del(3)(p26.3p25.3),der(15)t(2;15)(p14;q26.1) [2]

Byla prokázána delece oblasti 13q14, která se vyskytovala v 8 % buněk společně s trizomií 12. Zároveň byla prokázána duplikace genu *ALK* (2p23) ve 49 % buněk. Bylo zjištěno, že se duplikovaná část chromozomu 2 translokovala na derivovaný chromozom 15: der(15)t(2;15)(p14;q26.1). Dále byla prokázána přítomnost der(3)dup(3)(q21.2q29)t(3;3)(q21.2;p25.3)del(3)(p26.3p25.3), v rámci kterého došlo k duplikaci genu *BCL6* (3q27). Translokace t(18;22)(q21;q11) s přestavbou genů *BCL2/IGL* byla prokázána ve 42 % buněk.

Na základě výsledků a klinických projevů byla u pacienta v roce 2016 zahájena léčba režimem FCR. Pro relaps byla v roce 2018 nasazena terapie Imbrivicou, která pokračuje dodnes a pacient je pravidelně sledován.

## Výsledek aCGH u pacienta 12

Pacient č. 36 je žena, rok narození 1933. CLL ji byla diagnostikována v roce 2010 (77 let), přičemž léčba u ní byla zahájena v roce 2017, po 7 letech sledování. Touto dobou byla pacientka vyšetřena metodou aCGH, viz Obrázek 15.



Obrázek 15: Výsledek aCGH u pacienta 36 se zmožením na chromozomu 12

Na obrázku je výsledek hybridizace s použitím aCGH čipu 4x180 K (Agilent). Profily chromozomů jsou seřazeny od 1 po 22 a gonozomy X, Y zleva doprava. Podél chromozomu je zobrazen poměr intenzit signálu Cy3/Cy5. Zmnožení materiálu je znázorněno modře z pravé strany podél profilu chromozomu a ztráty materiálu jsou označeny červeně z levé strany chromozomu. Podrobně je zobrazen chromozom 12, u kterého byla pozorována jak trizomie celého chromozomu, tak zmnožení části dlouhých ramen chromozomu 12 v oblasti 12q13.13–12q21.1 o velikosti 18 161 989 bp. V této oblasti se nachází následující kandidátní geny potenciálně zapojené v patogenezi CLL: *ITGA7*, *RDH5*, *MMP19*, *SUOX*, *RPS26*, *ERBB3*, *SLC39A5*, *STAT2*, *MIP*, *TAC3*, *STAC3*, *MARS*, *DDIT3*, *KIF5A*, *B4GALNT1*, *CDK4*, *CYP27B1*, *TSFM*, *DPY19L2*, *TMEM5*, *SRGAP1*, *TBK1*, *GNS*, *LEMD3*, *MSRB3*, *HMGA2*, *IRAK3*, *GRIP1*, *IFNG*, *NUP107*, *MDM2*, *LYZ*, *TPH2*. Kromě toho je v tomto případě zmnožen i úsek na chromozomu X v oblasti Xq21.31–Xq22.1 a současně došlo ke ztrátě heterozygoty v oblasti 18q12.2–18q21.1.

Kombinací metod G-pruhování, FISH a aCGH byl stanoven výsledný karyotyp:

46,XX,ins(4;12)(q?12;q?12?15),t(14;19)(q32;q13)[4/9]

47,XX,+12,t(14;19)(q32;q13)[3/9]

46,XX[2/9]

Byla prokázána translokace t(14;19)(q32;q13) s přestavbou genů *IGH* a *BCL3*, která se vyskytovala ve 44 % buněk. Dále byl nalezen derivovaný chromozom 4: ins(4;12)(q?12;q?12?15), který vznikl inzercí duplikované části dlouhých ramen chromozomu 12 do dlouhých ramen chromozomu 4. V druhém menším klonu buněk byla nalezena trizomie chromozomu 12.

Pacientka je od roku 2017 léčena chemoterapií, je pravidelně sledována a její stav je stabilní.

## 6 DISKUSE

Trizomie chromozomu 12 je u chronické lymfocytární leukémie třetí nejčastější chromozomovou aberací CLL s incidencí 10–20 %. Kromě CLL se trizomie 12 vyskytuje i u jiných B-buněčných lymfoproliferativních onemocnění, jako je např. prolymfocytární leukémie, vlasatobuněčná leukémie nebo Waldenströmova makroglobulinemie. Pacienti s CLL s touto změnou tvoří velice různorodou skupinu, jejíž přesný prognostický význam není doposud známý. Mnoho pacientů s touto změnou má horší klinická stádia a doba do zahájení léčby je srovnatelná s pacienty s delecí genu *TP53* (Döhner *et al.*, 2000).

Pro potřeby diplomové práce bylo z 1 123 pacientů s CLL léčených na HOK FN Olomouc do října 2021 vybráno 134 pacientů, kteří měli metodou FISH prokázanou trizomii chromozomu 12. Tato skupina tedy tvořila 11,9 %, což odpovídá údajům stanoveným Döhner *et al.* (2000) 10–20 %. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (2022) udává hodnotu 12–54 %, která je však založena na použití interfázni FISH. Právě tato metoda zvyšuje záchyt trizomie 12, je pro její detekci vhodnější a spolehlivější, a navíc nejsou pro analýzu potřeba metafázni chromozomy.

Medián věku stanovení diagnózy CLL byl v tomto souboru pacientů 67 let. Ten se shoduje s daty Národního onkologického ústavu v USA (NCI, *National Cancer Institute*) z let 2015–2019, která uvádí průměrný věk diagnózy 70 let. Soubor pacientů dále obsahoval 60 žen a 74 mužů (1 : 1,2), což se mírně rozchází s údaji NCI a se studií Roos-Weila *et al.* z roku 2018, kteří uvádí, že muži jsou CLL postihnuti dvakrát častěji než ženy. Rozdílné zastoupení žen a mužů v našem souboru může být způsobeno jak výběrem pouze pacientů s trizomií 12, tak relativně menším počtem pacientů zahrnutých v této práci.

Komplexní karyotyp spojovaný se špatnou prognózou se vyskytoval u 29 pacientů (21,8 %), což se shoduje s výsledky Roos-Weil *et al.*, 2018 (20 %). Trizomii 12 bez dalších cytogenetických změn mělo 57 pacientů (42,9 %). Tento výsledek je shodný s údaji v literatuře, která uvádí 40–60 % (Döhner *et al.*, 2000). Přestože je dle některých autorů trizomie 12 považována za příznivou změnu byl u 11 pacientů (8,2 %) pozorován klonální vývoj do komplexního karyotypu, u 3 z nich s přítomností delece genu *TP53*. Pomocí statistické analýzy bylo zjištěno, že trizomie chromozomu 12 vyskytující se samostatně má horší dopad na průběh onemocnění než trizomie 12 doprovázena další chromozomovou změnou. Tento jev zatím nebyl v literatuře popsán.

Nejčastější chromozomovou aberací byla u souboru pacientů s trizomií 12 delece 13q14 vyskytující se u 36 pacientů (27 %), přičemž byla nalezena častěji u žen než u mužů. Ta bývá obecně nejčastěji pozorovanou cytogenetickou změnou CLL (Hallek, 2019). Poměr pacientů se sice rozchází s výsledky Döhner *et al.*, 2000, ty se ale vztahují k celkovému počtu pacientů s CLL a ne pouze k pacientům s trizomií 12. Výsledky se ale shodují s Roos-Weilem *et al.*, 2018, který uvádí 25 % výskyt delece 13q14. Důležitým prognostickým faktorem spojeným s negativním průběhem onemocnění je přestavba genu *IGH* nacházející se u 10 pacientů (7,5 %) s trizomií 12. Tato genetická změna je u pacientů s CLL poměrně vzácná, Fang *et al.* (2019) ji například uvádí u 3 % všech CLL pacientů. U našeho vybraného souboru pacientů s trizomií 12 byl výskyt přestaveb dvakrát častější (7,5 %). Stejně procento pacientů (7,5 %) mělo ve svém genomu delecí genu *ATM*. Tato hodnota je mírně rozdílná od literatury, která udává 10–20 % (Döhner *et al.*, 2000), nicméně opět se jedná o všechny pacienty s CLL. Je ale podobná výsledku Falisi *et al.*, 2014, která u souboru pacientů s trizomií 12 stanovila delecí *ATM* v 4,5 % případů. Agresivita tohoto prognostického faktoru byla v souboru s trizomií 12 potvrzena (medián doby do úmrtí byl 5 let). Nízký výskyt delece 6q21, kterou uvádí literatura mezi 3–6 %. Vyskytoval se u 7 pacientů s trizomií 12 (5 %). Zároveň bylo potvrzeno spojení s komplexním karyotypem, který se vyskytoval u téměř poloviny pacientů. Delecí genu *TP53* mělo celkem 6 pacientů (4,5 %) s trizomií 12, což odpovídá dostupným údajům z literatury 4–7 % pacientů (Zenz *et al.*, 2010). U této skupiny byla dle očekávání pozorována kratší doba do léčby, což odpovídá současným léčebným doporučením pro pacienty s aberací *TP53*. Negativní dopad tohoto prognostického faktoru koreloval s rychlým průběhem nemoci i horšími klinickými stádii dle Bineta. Ojedinelá přítomnost byla potvrzena i v případě duplikace 8q24, jenž se vyskytovala u 5 pacientů (4 %). Tato hodnota odpovídá údajům 2–5 % v literatuře (Blanco *et al.*, 2014). Skoro polovina pacientů pak měla komplexní karyotyp spojený s nepříznivou prognózou.

Laboratoří molekulární biologie byl zjištěn mutační status genu *IGHV*. Mutace tohoto genu se vyskytovala u 44 pacientů s trizomií 12 (39 %). Zbýlých 61 % pacientů mělo gen *IGHV* nemutovaný. To potvrdilo, že trizomie 12 je obvykle spojována s nemutovaným *IGHV* (Abruzzo *et al.*, 2018). Tyto výsledky také odpovídají studii, která uvádí počet pacientů s trizomií 12 a nemutovaným genem *IGHV* 66 % (Roos-Weil *et al.*, 2018).

Jako doplnění vyšetřovacích metod byla u 70 pacientů ze souboru provedena array komparativní genomová hybridizace, která u 10 pacientů trizomii chromozomu 12 nepotvrdila. V těchto případech se však trizomie chromozomu 12 vyskytovala u méně než 20 % buněk, což je již za hranicí citlivosti metody aCGH. U dvou pacientů (3 %) objevila aCGH parciální



trizomii chromozomu 12. U pacienta 36 se konkrétně jednalo o oblast 12q13.13–12q21.1 o velikosti 18 161 989 bp. V tomto úseku se nachází např. kandidátní gen *MDM2*, což je onkogen, který je v autoregulační zpětné vazbě s nádorovým supresorem p53, jehož mutace je řazena mezi prognostické faktory (Watanabe *et al.*, 1994; Porpaczy *et al.*, 2009). Dalším kandidátním genem je *CDK4*, jejíž zvýšená exprese může, podle některých studií, vést k proliferaci B-lymfocytů (Decker *et al.*, 2002). U druhého pacienta (č. 101) byla parciální trizomie chromozomu 12 v oblasti 12q13.13–12q24.33. Kromě výše zmíněných se zde vyskytují kandidátní geny např. *HIP1R*, *MYF6* (Porpaczy *et al.*, 2009). *HIP1R* je protein často se vyskytující u lymfoidních malignit, který má schopnost transformovat lymfoidní buňky *in vivo* (Bradley *et al.*, 2007). *MYF6* kóduje myogenní regulační faktory řídící expresi svalově specifických genů a jeho exprese bývá spojována právě s trizomií chromozomu 12 (Porpaczy *et al.*, 2009).

Použití metody aCGH se u pacientů s CLL ukazuje jako přínosná metoda, protože dokáže odhalit chromozomové změny, které mohou uniknout pozornosti při klasickém cytogenetickém vyšetření či při cílené interfázní FISH. V našem souboru jsme detekovali 31 dalších aberací. Jednou z takových změn je např. právě zmnožení jen části dlouhých ramen chromozomu 12 bez zmnožení samotné centromerické oblasti chromozomu 12. Je proto velmi důležité kombinovat všechny uvedené cytogenetické, molekulárně cytogenetické a molekulárně biologické metody, abychom získali co nejpřesnější obraz chromozomových a genetických změn, které se odehrávají v průběhu CLL. Tato data společně s klinickými projevy onemocnění a dalšími parametry mohou hrát významnou roli při rozhodování o léčbě u jednotlivých případů nemocných.

## 7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo teoretické zpracování tematiky CLL se zaměřením na pacienty s trizomií chromozomu 12. Pomocí metody aCGH byly vyhodnoceny genetické změny u pacientů s CLL. Z databáze pacientů léčených s CLL na HOK FN Olomouc o celkovém počtu 1 123 bylo vybráno u 134 pacientů s CLL s trizomií 12. U těchto pacientů byla provedena analýza dostupných dat.

V tomto vybraném souboru byl sledován výskyt dalších chromozomových aberací v karyotypu a jejich případný dopad na průběh onemocnění. Nejčastěji pozorovanou změnou byla u 27 % delece 13q14, která je u obecně pacientů s CLL nejčtenější. Dále byla pozorována delece genu *ATM*, *TP53*, 6q21, přestavba genu *IGH* a duplikace 8q24 a další nenáhodné chromozomové změny s blížně neurčeným významem. Z výsledků vyplývá, že přítomnost dalších chromozomových aberací zlepšuje průběh onemocnění u pacientů s trizomií 12, zatímco samostatná trizomie pro pacienty tak příznivá není. Význam přítomnosti ostatních změn pro průběh onemocnění se nepodařilo statisticky prokázat. Metoda aCGH zvýšila záchyt nebalancovaných chromozomových změn, čímž přispěla k lepšímu poznání genomu pacientů s CLL.

## 8 LITERATURA

- Abruzzo, L.V., Herling, C.D., Calin, G.A., Oakes, C., Barron, L.L., Banks, H.E., Katju, V., Keating, M.J., Coombes, K.R. (2018): Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. *Haematologica* 103: 2069–2078.
- Agilent [online] [navštíveno 30. 6. 2021] Dostupné z [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4410-90020\\_CGH\\_ULS\\_3.5.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4410-90020_CGH_ULS_3.5.pdf).
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [online] [navštíveno 23. 4. 2022] Dostupné z <https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/2024/+12-or-trisomy-12>.
- Autore, F., Strati, P., Laurenti, L., Ferrajoli, A. (2018): Morphological, immunophenotypic, and genetic features of chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12: a comprehensive review. *Haematologica* 103: 931–938.
- Balatti, V., Bottoni, A., Palamarchuk, A., Alder, H., Rassenti, L.Z., Kipps, T.J., Pekarsky, Y., Croce, C.M. (2012): *NOTCH1* mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 119: 329–331.
- Baliakas, P., Jeromin, S., Iskas, M., Puiggros, A., Plevova, K., Nguyen-Khac, F., Davis, Z., Rigolin, G.M., Visentin, A., Xochelli, A., Delgado, J., Baran-Marszak, F., Stalika, E., Abrisqueta, P., Durechova, K., Papaioannou, G., Eclache, V., Dimou, M., Iliakis, T., Collado, R., Doubek, M., Calasanz, M.J., Ruiz-Xiville, N., Moreno, C., Jarosova, M., Leeksa, A.C., Panayiotidis, P., Podgornik, H., Cymbalista, F., Anagnostopoulos, A., Trentin, L., Stavroyianni, N., Davi, F., Ghia, P., Kater, A.P., Cuneo, A., Pospisilova, S., Espinet, B., Athanasiadou, A., Oscier, D., Haferlach, C., Stamatopoulos, K. (2019): Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood* 133: 1205–1216.
- Bejjani, B.A., Shaffer, L.G. (2006): Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics. *J Mol Diagn* 8: 528–533.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbes, S., Gremy, F. (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48: 198–206.

- Blanco, G., Puiggros, A., Rodríguez-Rivera, M., Melero, C., García-Malo, M.D., Collado, R., Ortega, M., Calasanz, M.J., Luño, E., Vargas, M.T., Grau, J., Martínez-Laperche, C., Valiente, A., Cervera, J., Piñán, Á., Hernández-Rivas, J.M., Batlle, A., Salido, M., Ortuño, F., Ardanaz, M., Ferrer, A., Ivars, D., Rodriguez, A., Abrisqueta, P., Espinet, B. (2014): Chromosome 8 Abnormalities (8p Losses and 8q Gains) in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Del(17p). *Blood* 124: 5638.
- Bockorny, B., Codreanu, I., Dasanu, C.A. (2012): Hodgkin lymphoma as Richter transformation in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective analysis of world literature. *Br J Haematol* 156: 50–66.
- Bradley, S.V., Smith, M.R., Hyun, T.S., Lucas, P.C., Li, L., Antonuk, D., Joshi, I., Jin, F., Ross, T.S. (2007): Aberrant Huntingtin Interacting Protein 1 in Lymphoid Malignancies. *Cancer Research* 67: 8923–8931.
- Burger, J.A. (2020): Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 383: 460–473.
- BYJU'S [online] [navštíveno 19. 6. 2021]  
Dostupné z <https://byjus.com/biology/allergies-autoimmunity/>.
- Creative Bioarray [online] [navštíveno 30. 6. 2021]  
Dostupné z <https://www.creative-bioarray.com/Services/Molecular-Karyotyping-aCGH-Service.htm>.
- Creative BioMart [online] [navštíveno 13. 9. 2021]  
Dostupné z <https://www.creativebiomart.net/resource/principle-protocol-fluorescence-in-situ-hybridization-fish-protocol-342.htm>.
- Cuneo, A., Rigolin, G.M., Bigoni, R., Angeli, C.D., Veronese, A., Cavazzini, F., Bardi, A., Roberti, M.G., Tammiso, E., Agostini, P., Ciccone, M., Porta, M.D., Tieghi, A., Cavazzini, L., Negrini, M., Castoldi, G. (2004): Chronic lymphocytic leukemia with 6q– shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 18: 476–483.
- Davis, A.S., Viera, A.J., Mead, M.D. (2014): Leukemia: an overview for primary care. *Am Fam Physician* 89: 731–738.
- Decker, T., Schneller, F., Hipp, S., Miething, C., Jahn, T., Duyster, J., Peschel, C. (2002): Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia* 16: 327–334.

- Dicker, F., Schnittger, S., Haferlach, T., Kern, W., Schoch, C. (2006): Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 108: 3152–3160.
- 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: 1910–1916.
- Easterbrook, J., Rybtsov, S., Gordon-Keylock, S., Ivanovs, A., Taoudi, S., Anderson, R.A., Medvinsky, A. (2019): Analysis of the Spatiotemporal Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in the Early Human Embryo. *Stem Cell Reports* 12: 1056–1068.
- Fabbri, G., Khiabani, H., Holmes, A.B., Wang, J., Messina, M., Mullighan, C.G., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Dalla-Favera, R. (2013): Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med* 210: 2273–2288.
- Falisi, E., Novella, E., Visco, C., Guercini, N., Maura, F., Giaretta, I., Pomponi, F., Nichele, I., Finotto, S., Montaldi, A., Neri, A., Rodeghiero, F. (2014): B-cell receptor configuration and mutational analysis of patients with chronic lymphocytic leukaemia and trisomy 12 reveal recurrent molecular abnormalities. *Hematol Oncol* 32: 22–30.
- Fang, H., Reichard, K.K., Rabe, K.G., Hanson, C.A., Call, T.G., Ding, W., Kenderian, S.S., Muchtar, E., Schwager, S.M., Leis, J.F., Chanan-Khan, A.A., Slager, S.L., Braggio, E., Smoley, S.A., Kay, N.E., Shanafelt, T.D., Van Dyke, D.L., Parikh, S.A. (2019): IGH translocations in chronic lymphocytic leukemia: Clinicopathologic features and clinical outcomes. *Am J Hematol* 94: 338–345.
- Flajnik, M. (2011): Immunology: The Origin of Sweetbreads in Lampreys? *Current Biology* 21: R218–R220.
- Galloway, J.L., Zon, L.I. (2003): 3 Ontogeny of hematopoiesis: Examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier: pp. 139–158.
- Gribben, J.G., O'Brien, S. (2011): Update on Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 29: 544–550.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., Stevenson, F.K. (1999): Unmutated Ig VH

- Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 94: 1848–1854.
- Hallek, M. (2019): Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 94: 1266–1287.
- Hu, B., Patel, K.P., Chen, H.-C., Wang, X., Luthra, R., Routbort, M.J., Kanagal-Shamanna, R., Medeiros, L.J., Yin, C.C., Zuo, Z., Ok, C.Y., Loghavi, S., Tang, G., Tambaro, F.P., Thompson, P., Burger, J., Jain, N., Ferrajoli, A., Bose, P., Estrov, Z., Keating, M., Wierda, W.G. (2019): Association of gene mutations with time-to-first treatment in 384 treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia patients. *British Journal of Haematology* 187: 307–318.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D., (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818–821.
- Keohane, E.M. (2016): *Rodak's hematology: clinical principles and applications* [5th ed.].
- Khan, M., Siddiqi, R., Thompson, P.A. (2018): Approach to Richter transformation of chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies. *Ann Hematol* 97: 1–15.
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., Dalla-Favera, R. (2010): The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* 17: 28–40.
- Kočárek, E., Pánek, M., Novotná, D., Univerzita Karlova (2006): *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Karolinum, Praha.
- Kojima, K., Taniwaki, M., Yoshino, T., Katayama, Y., Sunami, K., Fukuda, S., Omoto, E., Harada, M., Sezaki, T. (1998): Trisomy 12 and t(14;18) in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol* 67: 199–203.
- Krůzová, L., Papajík, T., Urbánková, H. (2020): Chromozomové změny u chronické lymfocytární leukemie, jejich prognostický a prediktivní význam. *Transfúze a hematologie dnes* 26(1): 19–28.
- Lexová, S. (2000): *Hematologie pro zdravotní laboranty*. 1. díl. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno.

- Lyengar, V., Shimanovsky, A. (2021): Leukemia, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- McCarthy, B.A., Boyle, E., Wang, X.P., Guzowski, D., Paul, S., CATERA, R., Trott, J., Yan, X., Croce, C.M., Damle, R., Yancopoulos, S., Messmer, B.T., Lesser, M., Allen, S.L., Rai, K.R., Chiorazzi, N. (2008): Surface Expression of Bcl-2 in Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Leukemias and Lymphomas without a Breakpoint t(14;18). *Mol Med* 14: 618–627.
- Mizuno, Y., Chinen, Y., Tsukamoto, T., Takimoto-Shimomura, T., Matsumura-Kimoto, Y., Fujibayashi, Y., Kuwahara-Ota, S., Fujino, T., Nishiyama, D., Shimura, Y., Kobayashi, T., Horiike, S., Taniwaki, M., Kuroda, J. (2019): A novel method of amplified fluorescent in situ hybridization for detection of chromosomal microdeletions in B cell lymphoma. *Int J Hematol* 109, 593–602.
- Molica, S. (2010): A systematic review on Richter syndrome: what is the published evidence? *Leuk Lymphoma* 51, 415–421.
- Nabhan, C., Raca, G., Wang, Y.L. (2015): Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA Oncol* 1, 965.
- National Cancer Institute [online] [navštíveno 16. 4. 2022]  
Dostupné z <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>.
- O'Connor, C. (2008): Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). *Nature Education* 1(1):171.
- Parikh, S.A., Strati, P., Tsang, M., West, C.P., Shanafelt, T.D. (2016): Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. *Blood* 127: 1752–1760.
- Payushina, O.V. (2012): Hematopoietic Microenvironment in the Fetal Liver: Roles of Different Cell Populations. *ISRN Cell Biology* 2012: e979480.
- Perinatal Medicine Foundation [online] [navštíveno 19. 6. 2021]  
Dostupné z <https://meet.perinatalmedicine.org/home/course/fgr-update-on-fetal-growth-restriction-04-05-december-2020/5>.
- Pflug, N., Bahlo, J., Shanafelt, T.D., Eichhorst, B.F., Bergmann, M.A., Elter, T., Bauer, K., Malchau, G., Rabe, K.G., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Jäger, U., Eckart, M.J., Hopfinger, G., Busch, R., Fink, A.-M., Wendtner, C.-M., Fischer, K., Kay, N.E., Hallek, M. (2014): Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic

- leukemia. *Blood* 124: 49–62.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934–2938.
- Porpaczy, E., Bilban, M., Heinze, G., Gruber, M., Vanura, K., Schwarzingner, I., Stilgenbauer, S., Streubel, B., Fonatsch, C., Jaeger, U. (2009): Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *European Journal of Clinical Investigation* 39: 568–575.
- Puiggros, A., Blanco, G., Espinet, B. (2014): Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *Biomed Res Int* 2014.
- Quijano, S., López, A., Rasillo, A., Sayagués, J.M., Barrena, S., Sánchez, M.L., Teodosio, C., Giraldo, P., Giralt, M., Pérez, M.C., Romero, M., Perdiguier, L., Orfao, A. (2008): Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 74: 139–149.
- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S. (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219–234.
- Rieger, M.A., Schroeder, T. (2012): Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Roos-Weil, D., Nguyen-Khac, F., Chevret, S., Touzeau, C., Roux, C., Lejeune, J., Cosson, A., Mathis, S., Feugier, P., Leprêtre, S., Béné, M.-C., Baron, M., Raynaud, S., Struski, S., Eclache, V., Sutton, L., Lesty, C., Merle-Béral, H., Cymbalista, F., Ysebaert, L., Davi, F., Leblond, V., FILO working group (2018): Mutational and cytogenetic analyses of 188 CLL patients with trisomy 12: A retrospective study from the French Innovative Leukemia Organization (FILO) working group. *Genes Chromosomes Cancer* 57: 533–540.
- Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Fangazio, M., Monti, S., Greco, M., Ciardullo, C., Famà, R., Cresta, S., Bruscaggin, A., Laurenti, L., Martini, M., Musto, P., Forconi, F., Marasca, R., Larocca, L.M., Foà, R., Gaidano, G. (2012): Different impact of *NOTCH1* and *SF3B1* mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 158: 426–429.
- Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Bruscaggin, A., Monti, S., Ciardullo, C., Deambrogi, C., Khiabani, H., Serra, R., Bertoni, F., Forconi, F., Laurenti, L., Marasca, R., Dal-Bo, M., Rossi, F.M., 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: 1403–1412.
- Singh, R., Soman-Faulkner, K., Sugumar, K. (2021): Embryology, Hematopoiesis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Smolej L., Špaček M., Pospíšilová Š., Jarošová M., Papajík T., Urbanová R., Šimkovič M., Lysák D., Brejcha M., Doubek M. (2021): Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukémie (CLL) 2021. [online] [navštíveno 28. 4. 2022]  
Dostupné z [https://cll.cz/sites/default/files/2021-01/Doporu%C4%8Den%C3%AD\\_%C4%8CSCLL\\_2021\\_final\\_28012021\\_web.pdf](https://cll.cz/sites/default/files/2021-01/Doporu%C4%8Den%C3%AD_%C4%8CSCLL_2021_final_28012021_web.pdf).
- Starostka, D., Míkula, P. (2014): Možnosti diagnostiky CD5-pozitivních B-lymfoproliferací. *Onkologie* 8: 102–106.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J. (2017): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Revised 4th edition. ed, World Health Organization classification of tumours. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Theisen, A. (2008): Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 1(1): 45.
- Trask, B.J. (2002): Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 3: 769–778.
- Van Dyke, D.L., Werner, L., Rassenti, L.Z., Neuberg, D., Ghia, E., Heerema, N.A., Dal Cin, P., Dell Aquila, M., Sreekantaiah, C., Greaves, A.W., Kipps, T.J., Kay, N.E. (2016): The Dohner fluorescence *in situ* hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol* 173: 105–113.
- Wang, H., Leng, Y., Gong, Y. (2018): Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. *Front. Endocrinol.* 9.
- Watanabe, T., Hotta, T., Ichikawa, A., Kinoshita, T., Nagai, H., Uchida, T., Murate, T., Saito, H. (1994): The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 84: 3158–3165.
- Wierda, W.G., O'Brien, S., Wang, X., Faderl, S., Ferrajoli, A., Do, K.-A., Cortes, J., Thomas, D., Garcia-Manero, G., Koller, C., Beran, M., Giles, F., Ravandi, F., Lerner, S., Kantarjian,

H., Keating, M. (2007): Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109: 4679–4685.

Zenz, T., Fröhling, S., Mertens, D., Döhner, H., Stilgenbauer, S. (2010): Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Practice & Research Clinical Haematology, Advances in Biology and Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia* 23: 71–84.