

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Mutační status a jiné chromozomální změny u chronické lymfatické leukémie

Bakalářská práce

Martina Šloufová

Školitel: MUDr. Ivan Vonke, MBA

České Budějovice 2019

Šloufová, M. (2019): Mutační status a jiné chromozomální změny u chronické lymfatické leukémie. [Mutation status and others chromosomal changes in chronic lymphocytic leukemia. Bc. Thesis, in Czech] - 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation:

This thesis is focused on mutation status and other chromosomal changes in chronic lymphocytic leukemia. CLL is a lymphoproliferative illness with a low malignancy based on clonal proliferacy of malignantly transformed B lymphocytes. Although this is the most frequent malignant illness in western population, the cause leading to its origin has not been yet clearly given. Identifying prognostic markers has a significant meaning in identifying the illness prognosis, the choice of treatment strategy, and it influences general survival of patients.

The aim of this thesis is to describe the frequency of the most usual mutations in patients suffering from CLL. All the results obtained from CLL patients were acquired from the Hospital in České Budějovice from 2016 to 2018.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 17. 4. 2019

.....
Martina Šloufová

Poděkování

Na tomto místě bych především ráda poděkovala panu primáři MUDr. Ivanu Vonkemu, MBA za cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou projevoval po celou dobu vedení bakalářské práce. Poděkování za podporu a trpělivost samozřejmě patří i celé mé rodině.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CHRONICKÁ LYMFATICKÁ LEUKÉMIE (CLL)	2
3	VÝVOJ LYMFOCYTŮ	3
3.1	Lymfoblast	3
3.2	Prolymfocyt	3
3.3	Lymfocyt.....	4
3.3.1	T-lymfocyty	4
3.3.2	B-lymfocyty.....	4
4	PŘÍZNAKY A PRŮBĚH NEMOCI	6
5	DIAGNOSTIKA CLL	7
6	PROGNOSTICKÉ FAKTORY	9
6.1	Klasické prognostické faktory	9
6.1.1	Klinický staging.....	9
6.1.1.1	Klasifikace dle Raie	9
6.1.1.2	Klasifikace dle Bineta	10
6.1.2	Zdvojovací čas lymfocytů	10
6.2	Nové prognostické faktory.....	11
6.2.1	Mutační stav IGVH	11
6.2.2	ZAP70 a CD38	12
6.2.3	Sérové markery.....	12
6.2.4	Cytogenetické prognostické faktory.....	13
6.2.4.1	Delece 13q14.....	14
6.2.4.2	Trizomie 12+	16
6.2.4.3	Delece 17p13.1.....	17
6.2.4.4	Delece 11q22-q23	18
7	LÉČBA CLL	19
7.1	Cytostatika	20
7.1.1	Chlorambucil	20
7.1.2	Fludarabin.....	21
7.1.3	Bendamustin	21
7.1.4	Cyklofosamid	21
7.2	Imunoterapie monoklonálními protilátkami	22
7.2.1	Protilátky proti antigenu CD20	22
7.2.1.1	Rituximab	22
7.2.1.2	Ofatumubab	23
7.2.1.3	Obinutuzumab	23

7.2.2	Protilátky proti antigenu CD52	24
7.2.2.1	Alemtuzumab	24
7.3	Inhibitory B-buněčného receptoru	24
7.3.1	Ibrutinib	25
7.3.2	Idelalisib	25
7.4	Transplantace krvetvorné tkáně	26
7.5	Kortikoterapie	26
8	CÍLE PRÁCE	28
8.1	Podcíle práce	28
9	MATERIÁLY A METODIKA	29
9.1	Stanovení mutačního statusu u CLL	29
9.2	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	29
9.3	Získání a zpracování dat	30
10	VÝSLEDKY	31
10.1	Mutační status CLL	32
10.2	Frekvence mutací	34
10.2.1	Delece IgH	34
10.2.2	Delece p53	36
10.2.3	Delece ATM	37
10.2.4	Trizomie 12	38
10.2.5	Delece Rb-1	40
10.2.6	Jiné mutace	41
10.2.7	Souhrnné grafy	43
11	DISKUZE	46
12	ZÁVĚR	50
13	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
14	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	62

1 Úvod

Chronická lymfatická leukémie (CLL) je jednou z nejčastějších leukémií v západních zemích (Scarfò *et al.*, 2016). Přestože se jedná převážně o nízcce agresivní onemocnění, existují i agresivnější formy spojené s horším klinickým průběhem. Tato heterogenita klinického průběhu byla dříve nevysvětlitelná, dokud studie nezjistily, že CLL klony jsou charakterizovány odlišnými fenotypovými a genotypovými rysy u různých pacientů (Ferrarini *et al.*, 2012). Pro lepší informovanost nově diagnostikovaných pacientů o průběhu jejich onemocnění, byly zavedeny stagingové systémy dle Raie a Bineta. Tyto systémy sice slouží k předpovídání přežití pacientů s CLL, ale nezohledňují jiné biologické vlastnosti buněk CLL, které mohou ovlivnit průběh onemocnění a reakci na léčbu (Amaya-Chanaga, Rassenti, 2016).

Díky novým molekulárně genetickým metodám byly získány další poznatky v oblasti patogeneze CLL a identifikovány moderní prognostické markery, jako je mutační stav těžkého řetězce imunoglobulinu (IGHV), exprese CD38 a ZAP70 u leukemických buněk a cytogenetické abnormality, které mají stěžejní vliv na klinický průběh choroby, volbu léčebné strategie a celkové přežití pacientů (Parikh, Shanafelt, 2016). Ve své bakalářské práci popisuji patologickou úlohu těchto prognostických markerů a podrobně se zabývám frekvencí nejčastějších mutací u pacientů s CLL.

2 Chronická lymfatická leukémie (CLL)

Chronická lymfatická leukémie (CLL) je nízcí agresivní lymfoproliferativní onemocnění, jehož podstatou je přeměna zralých lymfocytů v maligně transformované buňky (Adam, Vorlíček, 2001). V 95 % CLL vzniká transformací jediného klonu B-lymfocytů, který při diferenciaci zůstal ve stadiu časného nebo intermediárního B-lymfocytu a nepokračuje k normálnímu konečnému vývojovému stadiu (Friedmann, 1994). Tyto lymfocyty se nekontrolovatelně množí, neplní svoji původní funkci a poškozují organismus. Vyznačují se dlouhou životaschopností, protože nepodléhají apoptóze¹ tak rychle, jako zdravé buňky. Postupně dochází k akumulaci² nádorových buněk v kostní dřeni, krvi, mízních uzlinách a slezině. V kostní dřeni potlačují zdravou krevetvorbu, což má za následek nedostatek krevních buněk (Brychtová *et al.*, 2016).

Chronická lymfatická leukémie je nejčastějším typem leukémie v západní populaci (Hallek, 2017). V Evropě a Severní Americe tvoří zhruba 25–30 % všech leukémií. Incidence³ v Evropě je 3/100 000 (Adam, Vorlíček, 2001). Onemocnění postihuje převážně pacienty ve vyšším věku a medián při stanovení diagnózy se pohybuje mezi 67 a 72 lety. CLL se vyskytuje dvakrát častěji u mužů než u žen (Hallek, 2017).

Příčina vedoucí ke vzniku onemocnění zatím nebyla jednoznačně určena. Rodinný výskyt chronické lymfatické leukémie je vzácný, ale bylo prokázáno, že příímí příbuzní pacientů s chronickou lymfatickou leukémií mají vyšší pravděpodobnost onemocnění touto nemocí nebo jiným nádorovým onemocněním lymfatického systému (Brychtová *et al.*, 2016).

Termín chronická lymfatická leukémie (CLL) je používán také pro širší skupinu lymfoproliferativních onemocnění, které se projevují vyplavováním malých lymfocytů do periferní krve. Kromě B-chronické lymfatické leukémie řadíme do této skupiny také T-chronickou lymfatickou leukémií, B a T-prolymfocytární leukémií, splenický lymfom s vilózními lymfocyty a chronickou lymfatickou leukémií s velkými granulárními lymfocyty (Adam, Vorlíček, 2001).

¹ Programovaná smrt buňky (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

² Hromadění (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

³ Počet nově vzniklých případů dané nemoci ve vybrané populaci za určité časové období (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

3 Vývoj lymfocytů

Proces tvorby lymfocytů se označuje jako lymfopoéza. Hematopoetická kmenová buňka je společná pro lymfocyty a ostatní krvinky. Diferenciací kmenových buněk vznikají mateřské buňky zvláště pro granulocyty, erytrocyty, trombocyty a zvláště pro lymfocyty (Nemeth, Bodine, 2007). V dalším vývoji vznikají kmenové prekursorové buňky lymfoblasty, ze kterých další diferenciací a zráním vznikají prolymfocyty, které se už dále nedělí a dozrávají v lymfocyty (Anděl, Kozák, 2001).

Lymfopoéza může být klasifikována do 2 typů: primární a sekundární. Primární lymfopoéza probíhá extravaskulárně v centrálních lymfatických orgánech (kostní dřena brzlíku) a je spojena s počáteční produkcí imunokompetentních⁴ T a B-lymfocytů. Sekundární lymfopoéza probíhá v periferních lymfatických orgánech, kterými jsou slezina, lymfatické uzliny, lymfatické tkáně ve sliznicích gastrointestinálního a respiračního traktu. Zajišťuje udržení hladin lymfocytů v krvi a imunologickou integritu jedince (Harper, 1974).

3.1 Lymfoblast

Lymfoblast je nezralá buňka lymfatické řady a prekursor B a T-lymfocytů. Tvar lymfoblastu je kulatý s průměrem okolo 14 μm . Uvnitř obsahuje kulaté jádro s jemnou chromatinovou strukturou a jedním jadérkem (vzácně několik aktivních jadérek) (Anděl, Kozák, 2001). Jádro lymfoblastu je poměrně velké a zaujímá přibližně 80 % celkového objemu buněk. Cytoplazma je bazofilní a neobsahuje granula (Rozenberg, 2011).

Lymfoblast leukemických buněk se liší velikostí a tvarem. Chromatin je hustší než u normálního lymfoblastu, ale retikulární vzor zůstává zachován. Jádro je indentované nebo má nepravidelný tvar. Mohou být viditelné jedno až dvě jadérka. Bazofilní cytoplazma může obsahovat velká azurofilní granula nebo vakuoly (Harper, 1974).

3.2 Prolymfocyt

Prolymfocyt je charakterizován o něco hrubší chromatinovou strukturou než lymfoblast. Jeho průměr je 14–15 μm . Jádro se obvykle nachází v excentrické pozici a může být patrné jadérko. Bazofilní cytoplazma má hyalinový nebo transparentní vzhled a může obsahovat azurofilní granula (Harper, 1974).

⁴ Buňky zprostředkovávající imunitní odpověď (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

3.3 Lymfocyt

Zralý lymfocyt je menší velikosti než nezralé buňky a má hrubou kondenzovanou chromatinovou strukturu buněčného jádra. V něm se nachází jedno málo aktivní jadérko prstenčitého tvaru. Tvar jádra je kulatý nebo oploštělý. Cytoplazma je lehce bazofilní a uvnitř může být několik azurofilních granul. Lymfocyty dělíme do dvou základních skupin na B a T-lymfocyty (Anděl, Kozák, 2001).

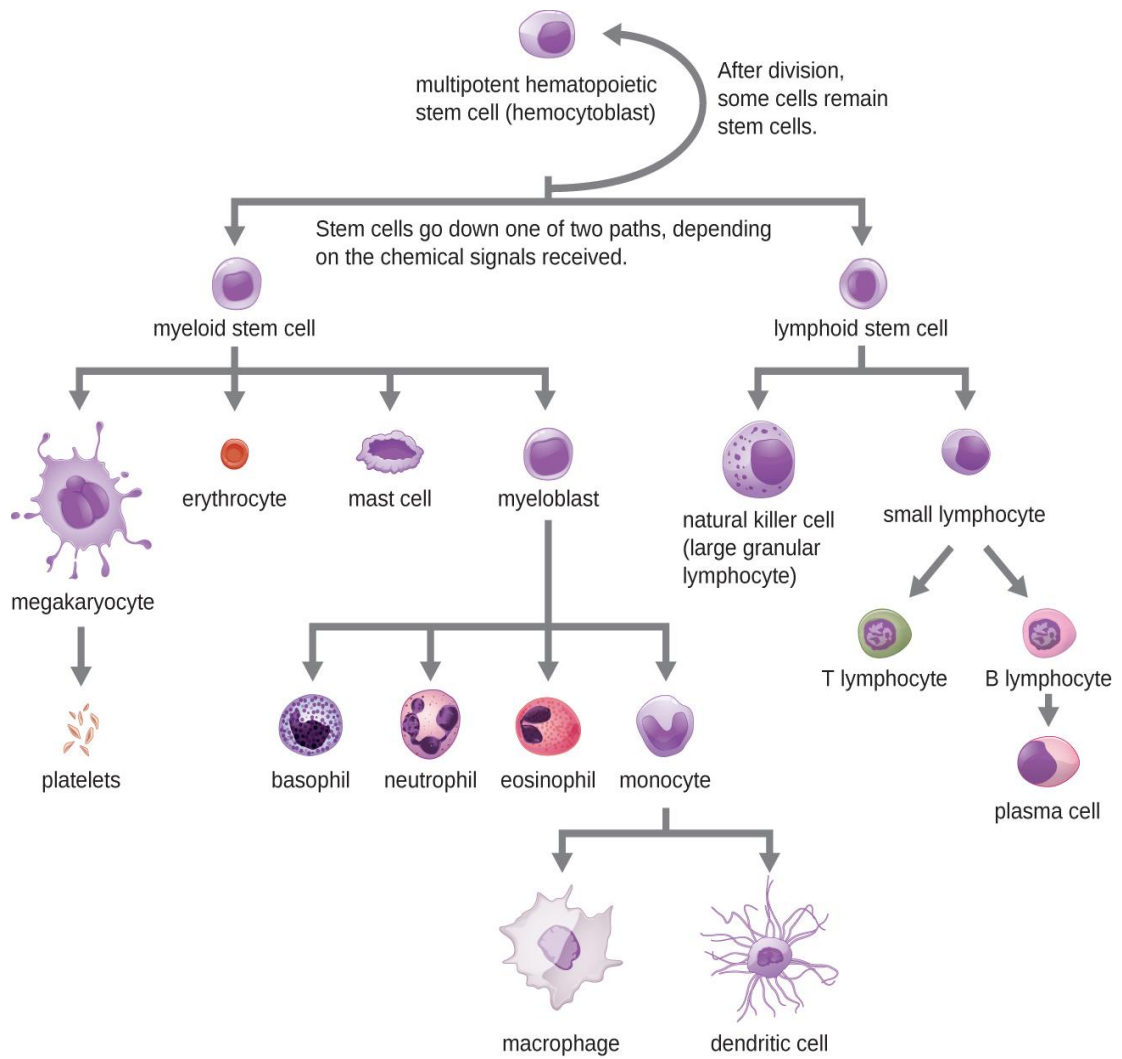
3.3.1 T-lymfocyty

T-lymfocyty jsou odvozeny od *thymu*⁵, kde probíhá i jejich diferenciaci. Nejvíce T-lymfocytů se nachází v periferní krvi, kde představují přibližně 70 % všech lymfocytů. Vyznačují se dlouhou životností, některé z nich až několik měsíců nebo let. T-buňky mají schopnost recirkulace, díky které mohou přestupovat z krve do lymfatických tkání a poté se vracet zpět do krve. Jejich fenotypickým markerem je CD2. Rozdělujeme je do dvou skupin. Buňky supresorové, cytotoxické nesoucí fenotypický znak CD8, a buňky pomocné, které nesou znak CD4. Hlavní funkce T-lymfocytů je buňkami zprostředkovaná imunita (Anděl, Kozák, 2001).

3.3.2 B-lymfocyty

Označení pro B-lymfocyty pochází od Fabriciovy burzy u ptáků a diferencují se v kostní dřeni. Tvoří zhruba 25 % lymfocytů cirkulujících v periferní krvi. Většina z nich žije krátkou dobu, 10 až 20 dní. Od T-lymfocytů se liší tím, že se z tkání nevracejí zpět do krevního oběhu. Jejich fenotypickým znakem je CD10, CD19 a CD20 a přítomnost povrchových imunoglobulinů (Anděl, Kozák, 2001). Konečným diferenciačním stádiem B-lymfocytů je plazmatická buňka. B-lymfocyty produkují protilátky proti specifickému antigenu a jsou zodpovědné za humorální imunitu (Tobón *et al.*, 2013). Poruchy vývoje B-buněk způsobují určité vrozené imunodeficiencie, leukémie a lymfomy nebo autoimunitní onemocnění (Lebien, Tedder, 2008).

⁵ Brzlík (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).



Obr. 1: Hematopoéza⁶(<https://bio.libretexts.org>).

⁶ Krvetvorba (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

4 Příznaky a průběh nemoci

Klinický průběh chronické lymfatické leukémie (CLL) je velmi variabilní, od indolentních forem až po pacienty s agresivním a rychle se rozvíjejícím onemocněním (např. defekt genu TP53 a ATM) (Puiggros *et al.*, 2014). Ve většině případů se choroba rozvíjí a postupuje velmi pomalu v průběhu měsíců a let, proto je obtížné zachytit toto onemocnění v prvotních stádiích rozvoje. Typické je dlouhotrvající asymptomatické období, během kterého dochází k množení nádorových buněk v organismu. U většiny nemocných je diagnóza CLL zachycena náhodně při vyšetření krevního obrazu (Brychtová *et al.*, 2016). Pozorovatelné jsou pouze abnormality v periferní krvi, jako např. lymfocytóza⁷ (Panovská, Doubek, 2013).

Pokud onemocnění není zachyceno náhodně z krevního obrazu, jedním z prvních příznaků, které na sobě pacient pozoruje, je nebolestivé zvětšení některé lymfatické uzliny. Celkové klinické projevy chronické lymfatické leukémie, tzv. B-symptomy se objevují až při pokročilejší fázi onemocnění, při obrovském počtu maligních buněk. Jsou způsobeny cytokiny⁸, produkovanými B-CLL buňkami nebo autoimunitním mechanismem. Mezi B-symptomy patří: horečka nad 38 °C, zvýšené (noční) pocení, větší úbytek hmotnosti (více jak 10 % hmotnosti za půl roku), celková slabost, únava, dušnost, bledost, bušení srdce, hučení v uších nebo bolesti na hrudi (Palásek *et al.*, 2003).

U 15–30 % pacientů může být pozorována anémie⁹ a trombocytopenie¹⁰ v důsledku infiltrace kostní dřene. Při nedostatku krevních destiček dochází u pacientů k poruchám krevního srážení a k opakovaným krvácením z ran a nosu. Častými komplikacemi CLL jsou také infekce způsobené nedostatečnou funkcí humorálního a buněčného imunitního systému, kde dochází k poškození T-lymfocytů, NK-buněk, neutrofilů a makrofágů (Rodrigues *et al.*, 2016).

Vzácně u 5–10 % pacientů může dojít k rozvoji tzv. Richterova syndromu, který je definován jako transformace CLL v agresivnější a hůře léčitelnou formu leukémie. Nejčastěji se jedná o difúzní velký B-buněčný lymfom. Předpokladem pro vznik Richterova syndromu je přítomnost B-symptomů a známek agresivního onemocnění, dále také zhoršený výkonnostní stav a rychlý nárůst velikosti lymfatických uzlin (Rodrigues *et al.*, 2016).

⁷ Zvýšený počet lymfocytů v krvi (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

⁸ Látky bílkovinné povahy produkované buňkami a sloužící k jejich vzájemnému ovlivňování a předávání informací (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006)

⁹ Chudokrevnost, nedostatek hemoglobinu a červených krvinek (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

¹⁰ Nedostatek krevních destiček v krvi (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

5 Diagnostika CLL

Diagnostika CLL je založena na vyšetření krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem, mikroskopickém zhodnocení nátěru periferní krve a průtokové cytometrii periferní krve (Váleková *et al.*, 2014). Dle doporučení International Workshop on CLL (IWCLL) je pro diagnózu leukémie vyžadována přítomnost alespoň $5 \times 10^9/l$ ($5000/\mu l$) monoklonálních B-lymfocytů v periferní krvi po dobu delší než tři měsíce. Leukemické buňky jsou morfologicky malé, zrale-vypadající lymfocyty s úzkým lemem cytoplazmy a hutným jaderným chromatinem bez viditelného jádérka. Jsou extrémně křehké a mohou se částečně zlomit při přípravě krevního nátěru. Zbytky jader rozpadlých leukemických buněk jsou označovány jako tzv. Grumprechtovy stíny (Delgado *et al.*, 2013).

Kromě důkladného morfologického zhodnocení periferní krve je nejspolehlivějším testem pro diagnózu CLL imunofenotypizace¹¹ pomocí průtokové cytometrie (Delgado *et al.*, 2013). Leukemické buňky koexprimují na svém povrchu T-buněčný antigen CD5 a exprimují B-buněčný antigen CD19, CD20 a CD23. Hladiny povrchového imunoglobulinu CD20, CD79b jsou sníženy ve srovnání s normálními B-lymfocyty (Hallek *et al.*, 2008). K cytometrické diagnóze CLL a diferenciální diagnostice je možné využít skórovací systém Royal Marsden založený na expresi pěti povrchových znaků nádorových lymfocytů (Doubek *et al.*, 2018)

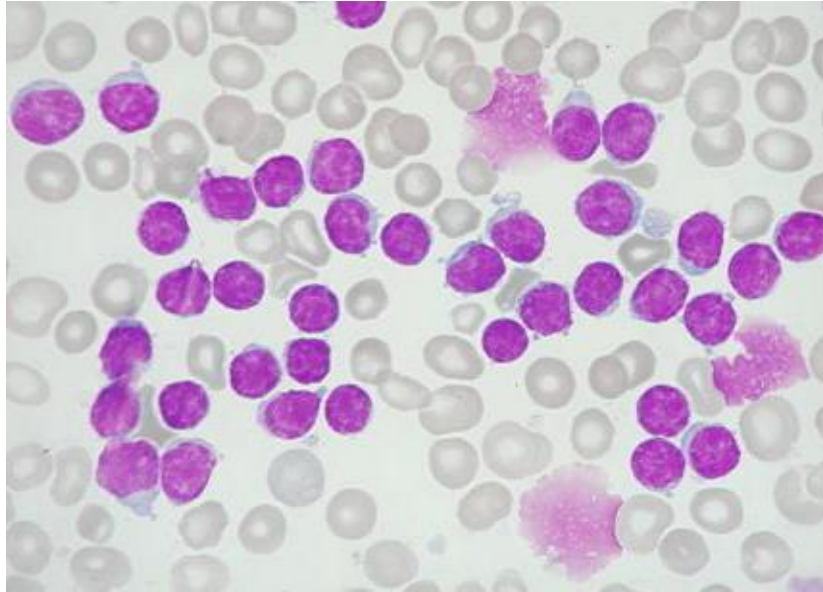
Tab. I: Diagnostická kritéria CLL dle IWCLL (převzato z Doubek *et al.*, 2018).

B-lymfocyty v periferní krvi $> 5 \times 10^9/l$
Morfologicky ≤ 55 % atypických buněk (např. prolymfocyty) v periferní krvi
Typický imunofenotyp

Tab. II: Skóre pro stanovení diagnózy CLL průtokovou cytometrií (převzato z Doubek *et al.*, 2018).

Ukazatel	Body (1)	Body (2)
CD5	pozitivní	negativní
CD23	pozitivní	negativní
CD79b	slabě	silně
FMC7	negativní	pozitivní
slg	slabě	silně

¹¹ Stanovení fenotypu na základě imunologické detekce povrchových znaků (markerů) buněk (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).



Obr. 2: Morfologický obraz CLL v periferní krvi (<http://www.medicabaze.cz/>).

Pro stanovení diagnózy chronické lymfatické leukémie již není nutné vyšetření kostní dřeně. Maligní klon B-lymfocytů lze jednoznačně identifikovat v periferní krvi. Vyšetření kostní dřeně je prováděno spíše k objasnění etiologie anémie či trombocytopenie (Váleková *et al.*, 2014). Biopsie kostní dřeně obvykle vykazuje hypercelularitu¹² v důsledku zvýšeného procenta zralých lymfocytů. Rozlišujeme čtyři modely lymfocytární infiltrace v kostní dřeni, modulární, intersticiální, smíšený a difúzní. Difúzní model je obvykle spojen s pokročilým onemocněním. V kostní dřeni je také sníženo množství erytroidních a myeloidních buněk (Kipps *et al.*, 2017).

K posouzení stupně lymfadenopatie¹³ nebo organomegalie¹⁴ jsou používány zobrazovací metody jako rentgenové vyšetření hrudníku, ultrazvuk dutiny břišní nebo CT vyšetření (Maurer, Hallek, 2013).

¹² Nadměrné zmožnění buněk (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

¹³ Zvětšení lymfatických uzlin (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

¹⁴ Zvětšení orgánů (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

6 Prognostické faktory

Průběh CLL je u pacientů výrazně různorodý. V některých případech pacienti vykazují indolentní průběh onemocnění, zatímco u jiných onemocnění postupuje velmi rychle a je spojeno s agresivnějším chováním choroby. Proto je nezbytné získat informace o individuální prognóze pacienta, aby bylo dále možné definovat terapeutickou strategii (Kay, Shanafelt, 2007). Prognostické faktory lze rozdělit na tzv. klasické a nové prognostické faktory (Motyčková *et al.*, 2011).

6.1 Klasické prognostické faktory

Mezi klasické prognostické faktory patří stanovení klinického stádia CLL a zdvojnásobení času lymfocytů (LDT). Další markery, které ovlivňují prognózu pacienta, jsou morfologie CLL buněk v periferní krvi, typ CLL infiltrace v kostní dřeni, věk, pohlaví a performance status (PS) pacienta v době diagnózy (Motyčková *et al.*, 2011).

6.1.1 Klinický staging

Klinické stadium onemocnění slouží k rozhodnutí o léčebné strategii a k odhadu prognózy pacienta. V klinické praxi jsou používány dva základní klasifikační systémy: klinický staging dle Raie a Bineta (Hadrabová, 2015). Jsou snadno použitelné a založené pouze na klinických údajích. Berou v úvahu postižení lymfatických uzlin, sleziny a jater i přítomnost cytopenií (anémie a trombocytopenie) (Rodrigues *et al.*, 2016).

6.1.1.1 Klasifikace dle Raie

Klasifikační systém dle Raie byl poprvé představen v roce 1975 a byl založen na pěti klinických stádiích označených římskými číslicemi od 0 po IV. Pacienti se stadiem 0 až I byli spojeni s příznivou prognózou, zatímco pacienti ve stádiu III a IV vykazovali poměrně krátké přežití. Prognóza pacientů se stádiem II byla střední (Beutler *et al.*, 1995). Originální klasifikace dle Raie byla v roce 1987 modifikována a z původních pěti prognostických skupin zůstaly pouze tři, které definují tři prognostické skupiny pacientů s nízkým (stadium 0), středním (stadium I a II) a vysokým (stadium III a IV) rizikem (Kaur, 2018). Pacienti s nízkým rizikem mají medián celkového přežití delší jak 150 měsíců, narozdíl od pacientů se středním a vysokým rizikem, kde medián činí přibližně 90 a 19 měsíců (Beutler *et al.*, 1995).

Tab. III: Klinické stádium CLL – klasifikace dle Rai (převzato z Panovská, Doubek, 2013).

Modifikovaný Rai		Původní Rai	Medián OS (měsíce)
nízké riziko (LR)	pouze lymfocytóza	0	> 150
střední riziko (IR)	lymfocytóza / lymfadenopatie / splenomegalie / hepatomegalie	I–II	101 (I) 71 (II)
vysoké riziko (HR)	Hb < 110 g/l a Plt < 100 × 10 ⁹ /l	III–IV	19

6.1.1.2 Klasifikace dle Bineta

V roce 1981 byl navrhnout třístupňový klasifikační systém dle Bineta. Nejpokročilejší stádium (stadium C) popisuje pacienty, kteří mají anémii nebo trombocytopenii způsobenou dysfunkcí kostní dřeně. Zbývající pacienti jsou rozděleni do dvou kategorií, A a B, které jsou založeny na počtu zasažených lymfatických oblastí. Lymfatických oblastí bylo definováno pět: krční, axilární, femorální oblast, slezina a játra. Pacienti v kategoriích A a B mají méně než tři nebo tři a více postižených oblastí (Beutler *et al.*, 1995).

Tab. IV: Klinické stádium CLL – klasifikace dle Bineta (převzato z Panovská, Doubek, 2013).

Binet			Medián OS (měsíce)
A	Hb ≥ 100g/l a plt ≥ 100 × 10 ⁹ /l	žádná až dvě oblasti	nedosažen
B	Hb ≥ 100g/l a plt ≥ 100 × 10 ⁹ /l	tři a více oblastí	84
C	Hb < 100 g/l a plt < 100 × 10 ⁹ /l	libovolný počet	24

6.1.2 Zdvojovací čas lymfocytů

Zdvojovací čas lymfocytů (LDT) je doba, za kterou dojde ke zdvojnásobení počtu lymfocytů v periferní krvi. Nemocní, u kterých je LDT delší než 12 měsíců, mají velmi dobrou prognózu, zatímco LDT kratší než 12 měsíců, předpovídá rychlou progresi onemocnění s mediánem přežití (OS) 58 měsíců (Viñolas *et al.*, 1987). V současné době je spíše užíváno kritérium šest měsíců. Zdvojovací čas lymfocytů nižší než šest měsíců či nárůst absolutního počtu lymfocytů o 50 % za dobu kratší než dva měsíce, patří mezi kritéria zahájení léčby (Motyčková *et al.*, 2011).

6.2 Nové prognostické faktory

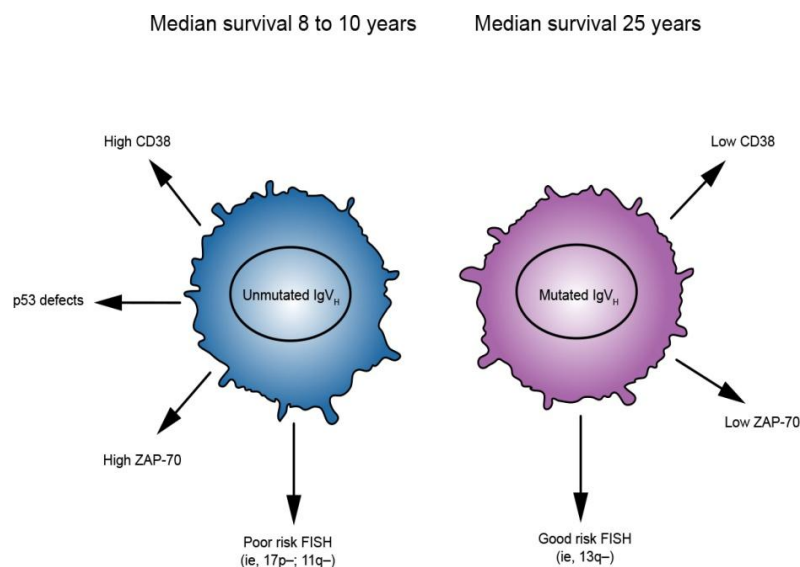
Během posledních několika let došlo k velkému pokroku v oblasti molekulárně genetických a cytogenetických metod (klasická cytogenetika, fluorescenční in situ hybridizace, čipová technologie nebo sekvenování nové generace), díky kterým byly definovány specifické chromozomální aberace, genové mutace a další markery CLL. Významně ovlivňují prognózu pacienta a další terapeutický postup (Navrkalová *et al.*, 2015). Mezi nové prognostické faktory patří mutační stav těžkého řetězce imunoglobulinu (IGVH), ZAP70 a CD38, sérové markery a cytogenetické abnormality (Smolewski *et al.*, 2013).

6.2.1 Mutační stav IGVH

Variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu (IGVH) funguje jako důležitý prognostický faktor u pacientů s CLL (Rozovski *et al.*, 2018). Přítomnost tohoto prognostického markeru, umožňuje rozdělit pacienty CLL do dvou základních skupin s jasně odlišnými klinicko-biologickými rysy. Tyto skupiny se liší tím, zda v leukemických buňkách došlo, či nedošlo k somatické hypermutaci IGVH genů (Adam *et al.*, 2008; Navrkalová *et al.*, 2015).

U mutovaného IGVH genu dochází k vývoji CLL až po reakci B-lymfocytu s antigenem, který prošel germinálním (zárodečným) centrem lymfatické uzliny. Klinický průběh onemocnění je příznivý a vykazuje dobré léčebné výsledky (Adam *et al.*, 2008; Navrkalová *et al.*, 2015). Jako nemutovaný označujeme IGVH gen s více než 98% sekvenční homologií s genem zárodečné linie. Tato hranice byla stanovena arbitrárně (Rozovski *et al.*, 2018). Leukemické buňky s nemutovaným IGVH se s antigenem sice setkaly, ale poté u nich nedošlo k somatické hypermutaci. CLL z naivních (pregerminálních) B-lymfocytů, které neprošly germinálním centrem, vykazuje agresivní průběh onemocnění spojený s vyšší frekvencí genomových abnormalit a horší prognózou (Adam *et al.*, 2008; Navrkalová *et al.*, 2015).

Medián celkového přežití (OS) pacientů s nemutovanými IGVH geny (95 měsíců) je výrazně kratší v porovnání s mutovanými IGVH geny (295 měsíců). Výjimku tvoří geny IGVH3.21, které jsou spojeny se špatnou prognózou bez ohledu na jejich mutační stav (Adam *et al.*, 2008).



Obr. 3: Schéma biologických rozdílů mezi mutovanými a nemutovanými B-CLL klony (<https://www.biooncology.com/html>).

6.2.2 ZAP70 a CD38

Dalšími prognostickými markery jsou molekuly zeta-asociovaný protein (ZAP70) a transmembránový glykoprotein CD38. Vyšší hladina exprese těchto molekul je asociována s nemutovaným IGVH genem a agresivnějším průběhem onemocnění. CD38 je exprimován ve vysokých hladinách v prekurzorech B-buněk, germinálním centru B-buněk, plazmatických buňkách a v nízkých hladinách i v cirkulujících B-buňkách. ZAP70 je exprimován na povrchu T-buněk a předává signály z T-buněčného receptoru (Parker, Strout, 2011).

Oba tyto markery se dříve používaly ke stanovení mutačního stavu IGVH genů, ale bylo zjištěno, že jejich exprese se mění v závislosti na klinickém průběhu choroby, proto dnes slouží pouze jako doprovodné prognostické markery k vyšetření mutačního stavu IGVH (Navrkalová *et al.*, 2015).

6.2.3 Sérové markery

Díky studiím bylo zjištěno, že sérové markery CD23, thymidinová kináza (TK) a β 2-mikroglobulin mohou předpovídat přežití. Vysoká hladina B2M (> 3,5 mg/l) je spojena s horší prognózou onemocnění (Hallek *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2015). Thymidinová kináza je produkována dělicími se buňkami a vysoká hladina je spojena se zvýšenou CLL proliferací. CD23 je produkován leukemickými buňkami a funguje jako nádorový marker (Parker, Strout, 2011).

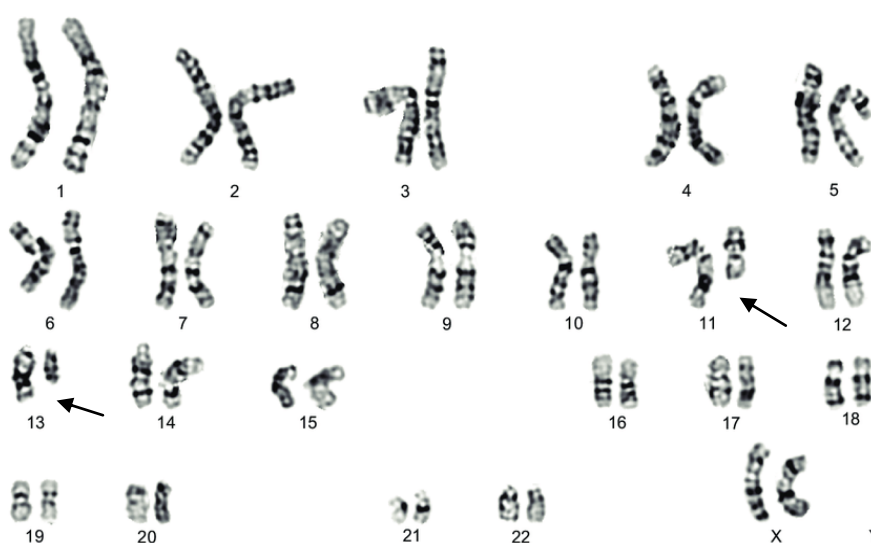
6.2.4 Cytogenetické prognostické faktory

Získané genetické změny se vyskytují u více než 80 % pacientů s CLL a hrají důležitou roli v patogenezi onemocnění. Jejich identifikace má zásadní význam pro stanovení prognózy onemocnění, volbu léčebné strategie a OS nemocných (Navrkalová *et al.*, 2015). Genetické markery od sebe umožňují rozlišit formy nemoci, které budou postupovat rychleji, mají horší odpověď na terapii a vyžadují zahájení léčby v počátečních stádiích nemoci, od forem, které mají stabilní klinický průběh a není nutné u nich zahájit terapii dříve než za několik let (Kozák, 2008).

Rozvoj nových technik jako fluorescenční in situ hybridizace (FISH) výrazně zvýšil detekci numerických a strukturálních chromozomálních abnormalit u CLL. Nejčastějšími cytogenetickými alternacemi definovanými pomocí metody FISH jsou delece 13q14, 11q22-q23, trizomie 12 a delece 17p13 (Döhner *et al.*, 2000).

Tab. V: Chromozomální aberace u CLL a celkové přežití (převzato z Kozák, 2008).

Karyotyp	% pacientů	Medián přežití (měsíce)
delece 17p	6	32
delece 11q	20	79
trizomie 12	16	114
delece 13q	36	113
normální karyotyp	18	111



Obr. 4: Delece chromozomu 11q a chromozomu 13q (převzato z Kiefer *et al.*, 2012).

6.2.4.1 Delece 13q14

Delece dlouhého raménka 13. chromozomu, zahrnující oblast 13q14, představuje jednu z nejčastějších cytogenetických aberací CLL. Tato genetická abnormalita byla detekována pomocí molekulárně genetické metody FISH zhruba u 55 % pacientů (Hallek, 2017). Je spojena se stabilním klinickým průběhem, dobrou prognózou a mutovaným IGVH genem. Medián celkového přežití (OS) činí 133 měsíců (Panovská, Doubek, 2013).

Deletovaná oblast 13q14 zahrnuje dva mikro RNA geny, miR-15-a a miR-16-1, které jsou deletovány nebo downregulovány ve většině případů CLL (Boelens *et al.*, 2009; Chiorazzi *et al.*, 2005; Roosbroeck, Calin, 2016). MiRNA jsou krátké nekódující molekuly RNA dlouhé 19–25 párů bází. Jejich hlavní funkcí je regulace genové exprese. Navázáním na molekulu mRNA brání překladu do bílkovin. Zasahují téměř do všech signálních, metabolických a regulačních drah, čímž se podílejí na udržování homeostázy. Jejich hladina se ve tkáních a tělních tekutinách mění vlivem vnějších stimulů nebo přítomností různých onemocnění. Ovlivňují řadu fyziologických procesů, jako je buněčná proliferace, diferenciaci nebo apoptóza, a mají tak výrazný vliv na vývoj nádorových onemocnění (Novák, 2016).

Rozlišujeme dva typy mikroRNA, tumor supresorové a onkogenní. Tumor supresorové miRNA tlumí expresi onkogenů a jejich hladina je u nádorů snížena. Funkcí onkogenních miRNA je inhibice tumor supresorových genů. V nádorech jsou nadměrně exprimovány a jejich hladina je zvýšená v porovnání se zdravou tkání (Bartošík, Jiráková, 2018). MiRNA kódované lokusem miR-15-a a miR-16-1 fungují jako supresory nádorů (Boelens *et al.*, 2009).

Tumor supresorové geny jsou geny kódující proteiny, které regulují buněčný cyklus a hrají důležitou roli při prevenci vzniku nádorových buněk. Pomocí různých mechanismů mohou zastavit buněčné dělení, opravit poškozenou DNA nebo způsobit apoptózu buněk, u kterých nemůže být poškozená DNA opravena. Pokud jsou tumor supresorové geny pozměněny nebo inaktivovány v důsledku mutace, kódují proteiny, které jsou méně efektivní při kontrole buněčného růstu a oprav. Nekontrolovatelný růst poškozených buněk vede k rozvoji nádorového onemocnění (Eldridge, 2019).

Tumor supresorová funkce miR-15-a a miR-16-1 je zprostředkována přímým působením na gen BCL2, který je členem rodiny regulačních proteinů (Hardwick, Soane, 2013; Pekarsky *et al.*, 2018). BCL2 regulační proteiny jsou schopné regulovat permeabilitu mitochondriální membrány během apoptózy. Tím dochází k translokaci apoptogenního

proteinu cytochromu c¹⁵ do cytoplazmy a aktivaci proteolytických proteinů způsobujících buněčnou smrt (Shimizu *et al.*, 1999). BCL2 regulační proteiny byly poprvé identifikovány v souvislosti s B-buněčným folikulárním lymfomem (Tzifi *et al.*, 2011). Jsou rozděleny do dvou podskupin, tzv. pro-apoptické (např. BAK, BAX) a anti-apoptické (např. BCL2, BCL-XL, BCL-W) (Opferman, Kothari, 2018).

Antiapoptické proteiny BCL2 a BCL-XL se váží na vnější mitochondriální membránu a inhibují apoptózu tím, že brání uvolňování cytochromu c z mitochondrie do cytoplazmy. Proapoptické proteiny BAK a BAX zvyšují propustnost membrány a indukují uvolňování cytochromu c z mitochondrie (Papaliagkas *et al.*, 2007). Mir-15-a a miR-16-1 snižují transkripční hladiny anti-apoptického proteinu BCL2, čímž se podporuje apoptóza (Boelens *et al.*, 2009).

Delece 13q14 vede k vymazání supresorových genů miR-15-a a miR-16-1 a je hlavním důvodem nadměrné exprese BCL2 u CLL (Majid *et al.*, 2008). Kromě těchto miRNA bylo studováno několik dalších genů lokalizovaných v minimální deletované oblasti (MDR), např. gen DLEU7 nebo DLEU2, které by mohly spolupracovat s miR-15-a a miR-16-1 jako supresory nádorů (Navrkalová *et al.*, 2015).

V nedávných studiích byly zmíněny dva typy delecí 13q14, tzv. krátký typ (typ I), který má bod zlomu blízko lokusu miR-15-a a miR-16-1 a nezahrnuje gen RB1, a typ větší (typ II), který zahrnuje RB1 spojený s větší genomickou složitostí a agresivnějším průběhem (Grygalewicz *et al.*, 2016).

Retinoblastom gen 1 (RB1) se nachází v oblasti 13q14. Tento gen kóduje jaderný protein, který působí jako kontrolní bod v G1 fázi buněčného cyklu. Gen RB1 je defektní nebo zcela chybí u většiny tumorů a předpokládá se, že defekt RB1 hraje patogenickou roli v CLL (Beutler *et al.*, 1995).

Delece 13q14 mohou být také heterozygotní (monoalelické) nebo homozygotní (bialelické). Bialelické delece se vyskytují u 30 % pacientů s delecí 13q14, jsou popisovány jako typ I a nezahrnují gen RB1. Typ II je častější a jedná se převážně o monoalelické delece (Grygalewicz *et al.*, 2016).

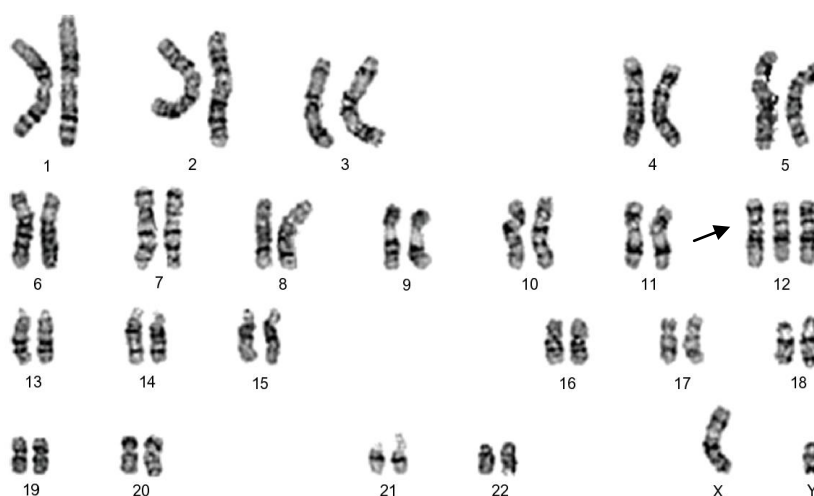
¹⁵ Součástí dýchacího řetězce, podílí se na transportu elektronů v membráně mitochondrie (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

6.2.4.2 Trizomie 12+

Trizomie 12. chromozomu je třetí nejčastější chromozomální aberací CLL. Postihuje 10–20 % pacientů a často se vyskytuje jako jediná cytogenetická alternace. Může však být i spojena s ostatními chromozomálními aberacemi (např. delece 14q, 13q nebo 17p) a IGVH translokacemi. První publikace spojují trizomii 12+ s agresivnějším klinickým průběhem, ale dle současných studií je charakterizována jako mutace s méně závažnou prognózou (Puiggros *et al.*, 2014). Medián přežití (OS) pacientů s trizonií 12+ je 114 měsíců (Panovská, Doubek, 2013).

Nejčastěji mutovaným genem u CLL je NOTCH1. NOTCH1 je transmembránový receptor, který se skládá z N-terminální extracelulární domény (NOTCH1-EC) a z C-terminální intracelulární domény (NOTCH1-TMIC). Obě domény jsou navzájem spojeny nekovalentními interakcemi (Rosati *et al.*, 2018). Vazbou ligandu na NOTCH1 receptor dojde k proteolytickému odštěpení intracelulární části domény, která je translokována do jádra, kde mění expresi cílových genů. Proteolytické odštěpení způsobuje enzym γ sekretáza. Jako ligand funguje protein zakotvený v buněčné membráně, proto k aktivaci dochází pouze při kontaktu dvou buněk (Čihák, 2011). Signály z NOTCH1 receptorů se podílejí na embryogenezi, regulují sebeobnovu kmenových buněk, asymetrické dělení a diferenciaci buněk (Klener, Klener, 2010).

NOTCH mutace jsou spojeny se špatnými výsledky a obtížnější léčbou. Bylo zjištěno, že prevalence NOTCH1 mutací se zvyšuje s agresivitou onemocnění (Giudice *et al.*, 2012; Rosati *et al.*, 2018).



Obr. 5: Trizomie 12+ (převzato z Kiefer *et al.*, 2012).

6.2.4.3 Delece 17p13.1

Delece krátkého raménka 17. chromozomu patří mezi nejzávažnější mutace CLL. Postihuje 5–10 % diagnostikovaných CLL a představuje nejdůležitější prognostický ukazatel. Pacienti s delecí 17p13.1 jsou řazeni do kategorie tzv. vysoce rizikových CLL. Vykazují horší prognózu v porovnání s ostatními chromozomálními aberacemi, rychlejší progresi do symptomatického onemocnění a mají špatnou odpověď na chemoterapii. Medián celkového přežití (OS) je dva až tři roky od stanovení diagnózy (Lysák, Schwarz, 2015).

Součástí lokusu 17q13.1 je gen TP53. Produktem tohoto genu je transkripční faktor p53 (Buka *et al.*, 2016; Lysák, Schwarz, 2015). P53 je také známý jako „strážce genomu“, protože reaguje na jeho poškození a působí jako nádorový supresor. Podílí se na regulaci buněčného cyklu, indukci apoptózy a ochraně buněk před škodlivými mutacemi (Simmons, 2018). P53 je fyziologicky inaktivní a je aktivován v reakci na buněčný stres (např. poškození DNA, hypoxie nebo oxidativní zátěž) (Lysák, Schwarz, 2015).

V cytoplazmě je navázán na přenašeč MDM2. Při poškození DNA dojde k vytvoření signalizační kaskády a fosforylaci přenašeče MDM2 a uvolnění proteinu p53, čímž se aktivuje. V jádře působí na gen p21, jehož produkt funguje jako inhibitor cyklin dependentních kináz. Tím dojde k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. P53 aktivuje transkripci genů, které opraví poškozenou DNA, a buňka může nadále pokračovat v dělení. Pokud je DNA příliš poškozena, dojde k indukci apoptózy. Mutace genu TP53 se častěji vyskytují u nemocných s nemutovanými IGHV geny (Lysák, Schwarz, 2015). Celková délka genu TP53 je 20 kb, skládá se z 11 exonů a 10 intronů (Kotala *et al.*, 2002).

Za normálních okolností, pokud buňka netrpí buněčným stresem, je protein p53 přítomen v nízkých hladinách díky dynamické rovnováze mezi jeho transkripcí a degradací. Tato rovnováha je velmi důležitá, protože velké množství proteinu p53 může být pro buňky smrtelné, zatímco příliš malé množství může vést k vývoji rakoviny (Surget *et al.*, 2014). V normálních buňkách se MDM2 váže na p53, aby se zabránilo jeho vazbě na DNA a nedošlo tak k její degradaci. Ve stresových buňkách mohou kinázy fosforylovat p53 a zabránit jeho vazbě s MDM2, což způsobuje nárůst hladin p53 (Simmons, 2018). Narušení rovnováhy mezi p53 a MDM2 může urychlit růst nádorových buněk (Atyabi *et al.*, 2017).

Pokud pacient trpí delecí 17p13.1, chybí mu protein p53 a nádorová buňka není schopna podstoupit apoptózu v důsledku poškození DNA (Buka *et al.*, 2016). S poruchou tumor supresorového genu p53 souvisí rezistence vůči chemoterapii (Stephens, Byrd, 2012).

6.2.4.4 Delece 11q22-q23

Delece dlouhého raménka chromosomu 11 postihuje 5–20 % pacientů. Tato cytogenetická abnormalita je spojena s agresivním průběhem onemocnění a medián celkového přežití (OS) činí 79 měsíců (Panovská, Doubek, 2013). Pacienti s delecí 11q22-q23 jsou z klinického hlediska charakterizováni rozsáhlou a mnohočetnou lymfadenopatií s nemutovanými IGVH geny. Případy s touto delecí mohou být klasifikovány jako tzv. velká delece, která se vyskytuje častěji, nebo jako tzv. malá delece, která je méně častá a spojena s ATM mutacemi (Puiggros *et al.*, 2014).

Na chromozomu v úseku 11q22-23 se nachází tumor supresorový gen ATM. Tento gen se podílí na rozpoznání a opravě poškozené DNA (Zhu *et al.*, 2008). Patří do rodiny genů fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) a skládá se z 66 exonů, z nichž 62 je kódujících. Funguje jako jaderná serin/threoninová kináza, jejíž aktivita je indukovaná dvouřetězcovými zlomy DNA (DSBs). Tyto zlomy jsou způsobeny exogenními (ionizující záření) i endogenními (poruchy replikace, meiotické rekombinace) procesy. ATM chrání integritu genomu tím, že zastaví buněčný cyklus v kontrolních bodech (G1/S, G2/M), čímž zabrání zpracování poškozené DNA a buňka získá čas k její reparaci. Poté dojde k aktivaci reparačních mechanismů a u poškozené DNA, která nemůže být opravena k indukci apoptózy (Guarini *et al.*, 2012).

V klidových buňkách se ATM vyskytuje v chemicky inaktivním stavu, ale je aktivován komplexem MRN a dalšími faktory, které se vyskytují v místě dvouřetězcových zlomů DNA (Paull, 2015). Mutace v genu ATM způsobují autozomální recesivní onemocnění *ataxia telangiectasia* (AT) spojené se zvýšenou incidencí malignit (Bullrich *et al.*, 1999). Kombinace delece 11q22-q23 a mutace genu ATM je spojena se sníženou odpovědí na alkylační činidla a purinové analogy, čili s rezistencí na chemoterapii (Jiang *et al.*, 2016).

7 Léčba CLL

Chronická lymfatická leukémie je nádorové onemocnění, které je v současné době dobře léčitelné, ale nelze ho zatím vyléčit úplně. Při nasazení vhodné léčby je ale toto onemocnění možné dostat pod kontrolu na dlouhé roky a zajistit tak pacientům kvalitní a plnohodnotný život. Volba léčby závisí na věku a stavu pacienta a na dalších charakteristikách CLL (stadium nemoci, projevy, rizikové faktory). Protože je CLL onemocnění s dlouhým bezpříznakovým obdobím a pomalým rozvojem, není nutné zahájit léčbu v počátečních stádiích nemoci (Palásek *et al.*, 2003). U nemocných, kteří nemají klinické příznaky nemoci a jsou ve stadiu A dle Bineta nebo 0 a I dle Rai, je doporučeno pouze sledování. Naopak u pacientů s pokročilou chorobou s klinickým stadiem Rai III, IV nebo Binet C je třeba neodkladně zahájit terapii. U pacientů v klinickém stadiu Rai II, III a Binet B se doporučuje zahájit léčbu pouze tehdy, pokud nemoc výrazně progreduje nebo pokud jsou přítomny B symptomy (Mayer, Starý, 2002).

Tab. VI: Indikace k zahájení léčby CLL (převzato z Rodrigues *et al.*, 2016)

1.	Selhání kostní dřeně s rozvojem anémie/trombocytopenie.
2.	Masivní splenomegalie ¹⁶ (nejméně 6 cm pod levým žeberním obloukem), která je progresivní nebo symptomatická.
3.	Masivní lymfadenopatie (nejméně 10 cm v nejdelším průměru) nebo progresivní nebo symptomatická lymfadenopatie.
4.	Progresivní lymfocytóza se zvýšením o více než 50 % během dvou měsíců nebo LDT méně než šest měsíců. Kromě toho by měly být vyloučeny faktory přispívající k lymfocytóze nebo lymfadenopatii jiné než CLL (např. infekce).
5.	Autoimunitní onemocnění (anémie/trombocytopenie) se špatnou odpovědí na kortikosteroidy nebo jiné standardní léčby.
6.	Systémové příznaky související s onemocněním: úbytek hmotnosti o 10 % nebo více za posledních šest měsíců, významná únava (stav dle ECOG 2 nebo horší; neschopnost pracovat nebo provádět obvyklé činnosti), horečka vyšší než 38 °C po dobu dvou nebo více týdnů bez důkazu infekce a noční pocení po dobu delší než jeden měsíc bez důkazu infekce.

¹⁶ Zvětšení sleziny (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

7.1 Cytostatika

Jednou ze základních možností léčby chronické lymfatické leukémie je chemoterapie. Léčba funguje na principu podávání cytostatik. Tyto syntetické látky ničí nádorové buňky a inhibují buněčný růst. Mohou být užívány ve formě tablet, nitrožilních injekcí nebo infuzí.

Chemoterapie má i nežádoucí účinky, protože cytostatika nejsou zaměřena pouze na nádorové buňky, ale poškozují i zdravé buňky tkání. K nejčastějším nežádoucím účinkům patří nevolnost, zvracení, vypadávání vlasů, infekce, poškození sliznic a krvetvorby. Aby bylo dosaženo co největšího účinku cytostatik a zároveň sníženy nežádoucí účinky, je používána především kombinovaná cytostatická léčba.

Podávání chemoterapie probíhá v určitých časových intervalech, během kterých dochází k vyloučení cytostatik z těla a regeneraci organismu tak, aby byl pacient schopen podstoupit další léčbu (Brychtová *et al.*, 2016).

7.1.1 Chlorambucil

Od 60. let 20. století byl k léčbě CLL používán chlorambucil (CLB), obchodním názvem Leukeran. Jedná se o alkylační činidlo podávané perorálně. Jeho výhodou je nízká toxicita a nízké náklady. V současné době je stále používán jako léčba pacientů první linie, zejména u starších komorbidních pacientů a u pacientů, kteří nemohou tolerovat terapii purinem. Chlorambucil je obvykle podáván jako jednorázová pulzní dávka 40 mg/m² každých 28 dnů (Awan, Byrd, 2018).

Chlorambucil je schopný vázat se na různé buněčné struktury. Jeho hlavní protinádorová aktivita spočívá v krosslinkování řetězců DNA, čímž zabraňuje replikaci a indukuje apoptózu (Goede *et al.*, 2014). Celková odpověď na léčbu se pohybuje mezi 30–70 %, avšak počet dosažených kompletních remisí je velmi nízký (0–5 %). Většinou dosahuje jen částečné remise nebo stabilizace onemocnění. Léčba pacientů chlorambucilem s počátečním stádiem (Binet A nebo Rai 0) sice zpomaluje rychlost progresu onemocnění, ale nezvyšuje přežití (Rozman *et al.*, 1995). Mezi nežádoucí účinky chlorambucilu patří zažívací problémy a útlumy krvetvorby (Panovská, Doubek, 2013).

7.1.2 Fludarabin

V 80. letech 20. století byl objeven purinový analog fludarabin (FDR), prodáváný pod obchodním názvem Fludara. Fludarabin pracuje na principu blokování syntézy DNA. Naruší se reparační mechanismy, dojde k depleci¹⁷ ATP, nahromadění fragmentů DNA a následné apoptóze maligních lymfocytů (Smolej, 2010). Celková odpověď na léčbu a počet dosažených kompletních remisí je vyšší (7–40 %) než u výše zmíněného chlorambucilu (Panovská, Doubek, 2013).

FDR byl později vyzkoušen v kombinaci s alkylační látkou cyklofosfamidem, která se stala základem dnešních léčebných režimů s monoklonálními protilátkami. K jeho nevýhodám patří vyšší hematologická toxicita a riziko autoimunitní hemolytické anemie (Panovská, Doubek, 2013).

7.1.3 Bendamustin

Bendamustin kombinuje vlastnosti alkylační látky a purinového analoga (Zuchnická *et al.*, 2016). Jedná se o chemoterapeutickou látku, která vykazuje jedinečný model cytotoxicity ve srovnání s konvenčními alkylačními činidly. Bendamustin aktivuje stresovou odpověď při poškození DNA, indukuje apoptózu, inhibuje mitotické kontrolní body a vyvolává mitotickou reakci (Cheson, Leoni, 2011).

Nejúčinnější kombinací bendamustinu s ostatními chemoterapeutiky je bendamustin a rituximab (režim BR) (Bergmann, Wendtner, 2015). V současné době je doporučen jako léčba první linie pacientů s CLL ve věku nad 65 let, u komorbidních¹⁸ pacientů a u pacientů s renální insuficiencí (Zuchnická *et al.*, 2016).

7.1.4 Cyklofosfamid

Cyklofosfamid je alkylační cytostatikum a součástí režimu FCR. Jeho vlivem dochází k poškození DNA, což způsobuje narušení buněčného cyklu. Nejčastějšími nežádoucími účinky při podávání cyklofosfamidu jsou hematologická toxicita, infekce nebo poškození močového traktu (Zuchnická *et al.*, 2016).

¹⁷ Úbytek, nedostatek (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

¹⁸ Současný výskyt více nemocí (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

7.2 Imunoterapie monoklonálními protilátkami

Zavedení monoklonálních protilátek přispělo k výraznému zlepšení léčby CLL. Monoklonální protilátky působí cíleně na nádorovou buňku, jsou schopny vázat se na epitopy nádorových antigenů a způsobit tak zánik buňky. Účinkují třemi základními mechanismy: navozují cytolyzu prostřednictvím aktivace komplementu (CDC), aktivují cytotoxicitu závislou na protilátce (ADCC) nebo přímo indukují apoptózu (DCD) (Obrtlíková, Urbanová, 2015).

Nejprve byly syntetizovány protilátky myší, ale jejich velkou nevýhodou byla tvorba protilátek proti myší komponentě a vznik imunitních reakcí. Proto jsou monoklonální protilátky pomocí genového inženýrství upravovány tak, aby větší část protilátky tvořila lidská bílkovina (60–70 %) a zbylou menší část původní zvířecí bílkovina (30–40 %). Tyto protilátky označujeme jako chimérické a jejich generický název je má koncovkou „ximab“. Některé protilátky mohou být i zcela humánní, obsahují 5–10 % myší protilátky. Zakončení generického názvu je „zumab“ či „mumab“ (Slíva, Votava, 2010).

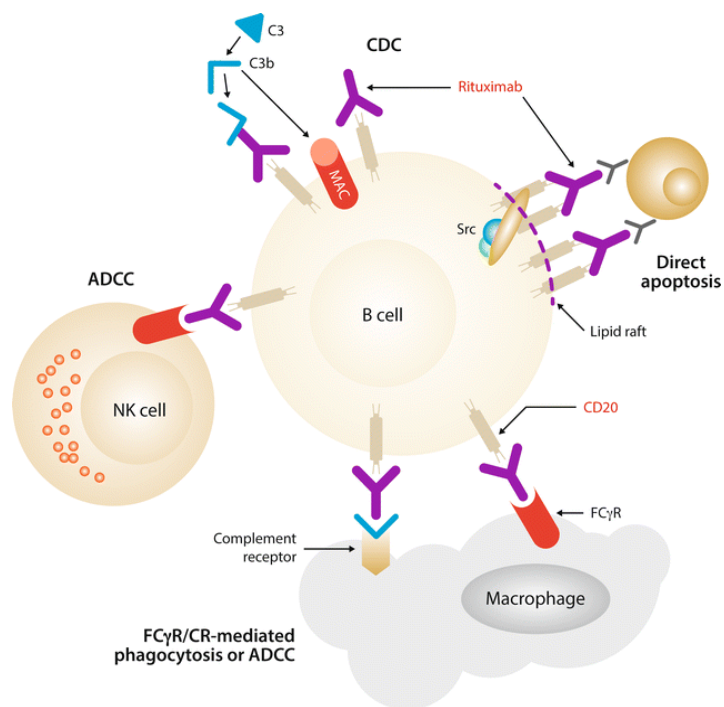
Monoklonální protilátky používané u chronické lymfatické leukémie jsou protilátky proti znakům CD20 a CD52 (Brychtová *et al.*, 2016).

7.2.1 Protilátky proti antigenu CD20

7.2.1.1 Rituximab

První chimérickou monoklonální protilátkou se stal rituximab (Rituxan) (Obrtlíková, Urbanová, 2015). Tato myší-lidská monoklonální protilátka má vysokou afinitu k povrchovému antigenu CD20, který se vyskytuje na povrchu normálních a maligních B-lymfocytů. Vazba rituximabu na antigen CD20 vyvolává odpověď, která vede k rychlému a trvalému vyčerpání normálních a maligních B-lymfocytů prostřednictvím několika mechanismů. Tyto mechanismy zahrnují přímý cytotoxický účinek, aktivaci komplementu a buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátce. Kmenové a plazmatické buňky jsou ušetřeny, protože postrádají antigen CD20 (Borthakur, Bryan, 2010).

Nejúčinnější chemoterapeutický režim kombinuje rituximab s fludarabinem a cyklofosfamidem (FCR). Režim FCR poskytuje vysokou míru dosažených remisí a byl prvním režimem, který zlepšil celkové přežití u pacientů s CLL (Borthakur, Bryan, 2010). V současné době se jedná o nejrozšířenější protilátku používanou k léčbě CLL. Pomocí tohoto režimu je v léčbě první linie dosahováno až 95 % léčebných odpovědí a kompletní remise (CR) byla zaznamenána v 52 % (Obrtlíková, Urbanová, 2015).



Obr. 6: Mechanismus buněčné smrti – rituximab (převzato z Salles *et al.*, 2017).

7.2.1.2 Ofatumubab

Ofatumubab (Arzerra) je plně lidská IgG1 monoklonální protilátka anti-CD20, která se váže na odlišný epitop antigenu CD20 než rituximab. Díky tomuto odlišnému mechanismu se uplatňuje i u nemocných rezistentních k léčbě rituximabem (Belada, 2008). Ofatumab zvyšuje cytotoxicitu závislou na komplementu a cytotoxicitu závislou na protilátce (Obřtlíková, Urbanová, 2015). Mezi nežádoucí účinky patří neutropenie¹⁹, pneumonie²⁰, pyrexie²¹, anémie, únava, nevolnost, bronchitida²² a infekce horních dýchacích cest (Österborg, 2010).

7.2.1.3 Obinutuzumab

Obinutuzumab (GA101) je plně humanizovaná protilátka CD20 typu II, která se váže k odlišnému epitopu antigenu CD20 než rituximab, čímž indukuje větší cytotoxicitu závislou na protilátce. Dávkovací režim je založen na 28denním léčebném cyklu. Ukázalo se, že obinutuzumab navozuje rychleji přímou buněčnou smrt v maligních B buňkách než rituximab a ofatumubab (Sachdeva, Dhingra, 2015).

¹⁹ Nízká hladina neutrofilů (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

²⁰ Zápal plic (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

²¹ Horečka (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

²² Záněť průdušek (Vokurka, Hugo *et al.*, 2006).

7.2.2 Protilátky proti antigenu CD52

7.2.2.1 Alemtuzumab

Alemtuzumab je rekombinantní plně humanizovaná protilátka namířená specificky proti povrchovému glykoproteinu CD52, který je exprimován na povrchu maligních i normálních T a B-lymfocytů, monocytů, makrofágů a granulocytů. Mechanismus indukce apoptózy alemtuzumabu je zprostředkováván pomocí aktivace komplementu a cytotoxicitou závislou na protilátce (Awan, Byrd, 2018).

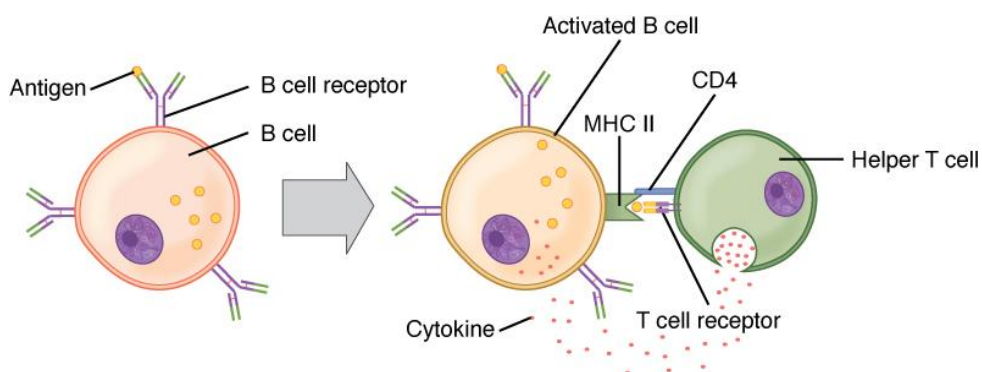
Alemtuzumab je možno použít jak v primoterapii u pacientů s CLL, pro něž není vhodná chemoterapie s fludarabinem, tak v léčbě relabované či refrakterní CLL (Obrtlíková, Urbanová, 2015). Alemtuzumab má prokázanou účinnost jak u del 11q, tak del 17p. V randomizované studii vykazoval alemtuzumab vyšší míru odpovědi a lepší PFS u pacientů než chlorambucil (Rodrigues *et al.*, 2016).

7.3 Inhibitory B-buněčného receptoru

Zásadní vliv na patogenezi CLL má B-buněčný receptor (BCR). Tento transmembránový protein je umístěný na povrchu B-lymfocytů a skládá se ze dvou částí: membránový imunoglobulin (Ig), který umožňuje vazbu na antigen, a intracelulární část, kterou tvoří řetězce Ig- α (CD79 α) a Ig- β (CD79 β) (Špaček, 2015).

Hlavní funkce BCR spočívá v aktivaci B-lymfocytů, jejich proliferaci a produkci protilátek. Po navázání antigenu na B-lymfocyt, dojde k aktivaci několika signálních drah. Antigen je endocytován pomocí BCR do buňky, kde je zpracován, rozložen v lyzozomech a exprimován zpět na membránu do komplexů MHC II. Poté je prezentován pomocným T-lymfocytům.

Jednou z klíčových kináz těchto signálních drah je BTK T_H (Fečková-Mihályová *et al.*, 2016). BCR-signalizační dráha obsahuje velké množství vzájemně interagujících kináz (např. SYK, LYN, BTK, PI3K), fosfatáz (SHP-1, SHIP) a adaptorových molekul (BLNK). Výsledkem aktivace BCR dráhy je produkce druhých poslů, např. IP3, DAG, a aktivace anti-apoptických drah jako NF κ B, RAS, AKT, PKC, p38MAPK, JNK, ERK a další (Mráz *et al.*, 2013).



Obr. 7: Mechanismus aktivace B-lymfocytů (<https://commons.wikimedia.org/>).

7.3.1 Ibrutinib

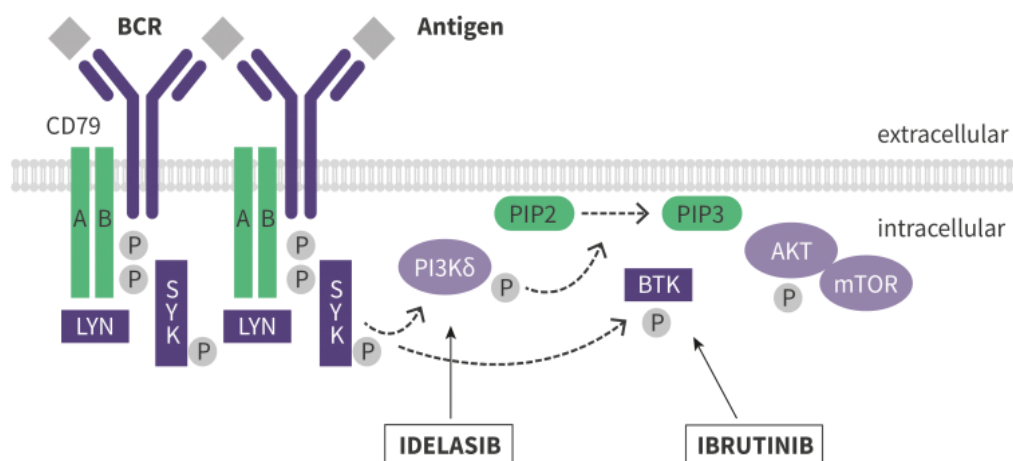
Rozpoznání funkce BCR a jeho signalizační dráhy umožnilo vývoj molekul, které inhibují jednotlivé enzymy této dráhy. Jedním z nich je ibrutinib, perorální inhibitor Brutonovy tyrosinkinázy (BTK). V České republice je dostupný od roku 2015. Zasahuje do signálních drah BCR, při vytvoření kovalentní vazby s cysteinovým zbytkem kinázy (Cys 481) brání její fosforylaci a blokuje tak signální dráhy receptorů (Fečková-Mihályová *et al.*, 2016). Další funkce spočívá v blokaci proliferace nádorových buněk, podporuje apoptózu a působí antagonisticky proti signálům z mikroprostředí (Šimkovič *et al.*, 2017).

Mezi nejčastější komplikace patří průjemy, únava, respirační infekce, nevolnost nebo pyrexie. Nežádoucími účinky pak fibrilace síní či krvácení (Fečková-Mihályová *et al.*, 2016). Ibrutinib prokázal významnou účinnost i u vysoce rizikových pacientů s delecí 17p nebo mutací TP53 (Špaček, 2015).

7.3.2 Idelalisib

Idelalisib (Zydelig) je dalším typem léčiva, který inhibuje signální dráhy B-buněčného receptoru. Jedná se o selektivní inhibitor fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K). Mechanismus idelalisibu spočívá v tom, že inhibuje enzym, který B buňky potřebují pro reprodukci a přežití. Cílem léku je zabránit progresi CLL tím, že se leukemické buňky přestanou množit (Šimkovič *et al.*, 2017).

Léčivo je užíváno dvakrát denně ve formě tablet (150 mg). Dávkování závisí na tom, jak dobře lék pacient toleruje a také na vedlejších účincích. V případě potřeby je dávkování upraveno individuálně. Léčba je ukončena, pokud onemocnění dále postupuje nebo se objeví velmi závažné nežádoucí účinky. Nejčastějšími komplikacemi při užívání idelalisibu jsou průjemy, hepatitida, kolitida a pneumotitida (Šimkovič *et al.*, 2017).



Obr. 8: Mechanismus idelalisibu a ibrutinibu (<http://www.lymphomation.org/>).

7.4 Transplantace krvetvorné tkáně

Autologní transplantace u CLL není v současné době standardní léčebnou metodou a je využívána minimálně. Alogenní transplantaci lze použít u agresivních forem, kdy onemocnění rychle postupuje a má nepříznivou prognózu. Pacient musí splňovat další podmínky, jako je mladší věk a malé množství komorbidit (Brychtová *et al.*, 2016).

7.5 Kortikoterapie

Kortikosteroidy se v současné době používají pouze při tvorbě autoprotilátek a slouží spíše jako doplňková léčba (Brychtová *et al.*, 2016).

Tab. VII: Přehled možností pro 1. linii léčby (převzato z Doubek *et al.*, 2018)

	Hlavní léčebná možnost	Další možnosti
Nemocní v dobrém stavu	FCR	alemtuzumab
		BR
		RCD či obdobný režim s vysokodávkovými kortikoidy
Delece 17p/mutace TP53:	ibrutinib	alemtuzumab
	idelalisib + rituximab	RCD či obdobný režim s vysokodávkovými kortikoidy
Nemocní s významnými komorbiditamiá	obinutuzumab + chlorambucil	alemtuzumab
	ofatumumab + chlorambucil	BO
		ibrutinib
	BR	nízkodávkový FCR
rituximab + chlorambucil	RCD či obdobný režim s vysokodávkovými kortikoidy	
Delece 17p/mutace TP53:	ibrutinib	alemtuzumab
	idelalisib + rituximab	RCD

Tab. VIII: Možnosti léčby relapsu/refrakterní CLL (převzato z Doubek *et al.*, 2018)

		Hlavní léčebná možnost	Další možnosti
Relaps CLL po $\geq 2-3$ letech		zopakování původní léčby	BR, FCR, LDFCR
Refrakterní CLL či relaps do 2-3 let či relaps s delecí 17p/mutací TP53	Nemocní v dobrém stavu	ibrutinib	alemtuzumab
		idelalisib + rituximab	BR
		alogenní transplantace	FCR
		venetoklax	ofatumumab
	platinové režimy		
	RCD či obdobný režim s vysokodávkovými kortikoidy		
	Významně komorbidní	ibrutinib	alemtuzumab
		idelalisib + rituximab	BR
		venetoklax	nízkodávkový FCR
			ofatumumab
	RCD či obdobný režim s vysokodávkovými kortikoidy		

8 Cíle práce

- Zjištění frekvence nejčastějších mutací u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií.

8.1 Podcíle práce

- Zhodnocení mutačního statusu u CLL.
- Určení počtu pacientů s jednotlivými mutacemi v závislosti na pohlaví.
- Porovnání průměrného věku pacientů s jednotlivými mutacemi v závislosti na pohlaví.

9 Materiály a metodika

Všechna potřebná vyšetření byla provedena v Ambulanci klinické hematologie a veškerá data získána z Laboratoře lékařské genetiky v Nemocnici České Budějovice, a. s.

9.1 Stanovení mutačního statusu u CLL

Účelem vyšetření je stanovení mutačního statusu variabilní části těžkého řetězce imunoglobulinu u pacientů s chronickou B-lymfocytární leukémií (B-CLL). Pro vyšetření je vyžadován vzorek periferní krve ve sterilních zkumavkách s přidavkem EDTA. Izolací získaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí náhodných hexanukleotidových primerů. Následně byla provedena PCR s touto cDNA a specifickými primery pro jednotlivé IGVH rodiny, výsledný amplikon byl zkontrolován dvakrát na agarózovém gelu a fragmentační analýzou, přečištěn a použit pro sekvenční reakce. Sekvenční reakce byly namíchány pro oba specifické primery použité při PCR.

Pro hodnocení mutačního statusu je nutné, aby se jednalo o produktivní přestavbu (tedy takovou, kde dochází k přesnému spojení V-J segmentů a vzniku funkční molekuly imunoglobulinu). Pro vlastní hodnocení mutačního statusu je stanoven cut off sekvenční homologie s referenční nemutovanou sekvencí 98%. Sekvenční homologie rovna 98% a vyšší, znamená nepříznivou prognózu pro pacienta (jedná se o nemutovaný klon B lymfocytů, kdy nedochází při zrání buněk k somatickým hypermutacím). Sekvenční homologie menší než 98 % - znamená příznivou prognózu pro pacienta (jedná se o mutovaný klon B lymfocytů).

9.2 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

FISH je molekulárně genetická metoda, která se používá k detekci chromozomálních aberací. Je založena na schopnosti jednovláknové sondy DNA vázat se k cílové sekvenci (podle pravidel komplementarity). DNA sonda je předem označena fluorescenčním barvivem a výsledný signál se analyzuje pomocí fluorescenčního mikroskopu. FISH se používá pro vyšetření chromozomů v mitóze nebo v interfázi.

9.3 Získání a zpracování dat

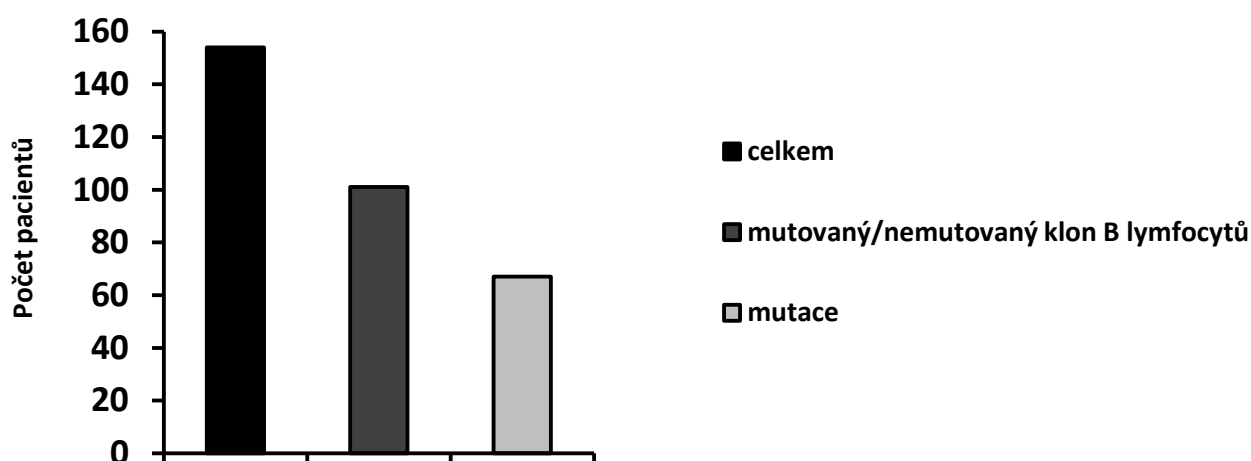
Veškerá data potřebná pro tuto práci byla získána z databáze laboratorního informačního systému (LIS) OpenLims Ambulance klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a. s. Takto získaná data byla následně zpracována pomocí programu MS Excel 2016. Byla použita data pacientů z období 1. 1. 2016 až 31. 12. 2018.

Pro práci byla použita data 164 pacientů mezi 37 až 91 lety s diagnózou CLL, kteří byli léčeni v Ambulanci klinické hematologie v Nemocnici České Budějovice a část v okrese jihočeského regionu. Deset pacientů se nepodařilo vyšetřit. Nebylo možné vyjádřit se k prognóze onemocnění nebo u nich vyšetření po konzultaci s hematologem nebylo vyžadováno. U 154 pacientů bylo následně provedeno vyšetření mutačního statusu u CLL, cytogenetické zhodnocení chromozomálních aberací a molekulárně genetická metoda FISH.

Pomocí databáze LIS jsem u pacientů dohledala sekvenční homologii a zjišťovala, zda se jedná o nemutovaný či mutovaný klon B lymfocytů, což má zásadní význam pro určení prognózy pacienta. Dále jsem se zaměřila na přítomnost patologických klonů s jednotlivými typy mutací CLL, konkrétně delece IgH, delece ATM, delece p53, delece Rb-1 trizomie chromozomu 12 a jiné. Do výsledků jsem zohlednila procentuální zastoupení pacientů s pozitivním a negativním nálezem nejčastějších mutací, počet pacientů s určitými typy delecí v závislosti na pohlaví a také průměrný věk mužů a žen, u nichž byly přítomny jednotlivé mutace.

10 Výsledky

Pro práci byl získán soubor 154 vyšetřených pacientů mezi 37 až 91 lety s diagnózou CLL. Konkrétně se jednalo o 91 mužů a 63 žen. Průměrný věk pacientů činil u mužů $70 \pm 0,99$ let a u žen $70 \pm 1,07$ let. Z celkového souboru 154 pacientů byl u 101 pacientů nalezen mutovaný nebo nemutovaný klon B lymfocytů a u 67 pacientů prokázána pomocí metody FISH přítomnost patologických klonů mutací. U 30 pacientů byl přítomen mutovaný či nemutovaný klon B lymfocytů a zároveň i mutace. Veškeré výsledky jsou podrobně zpracovány v následujících grafech.

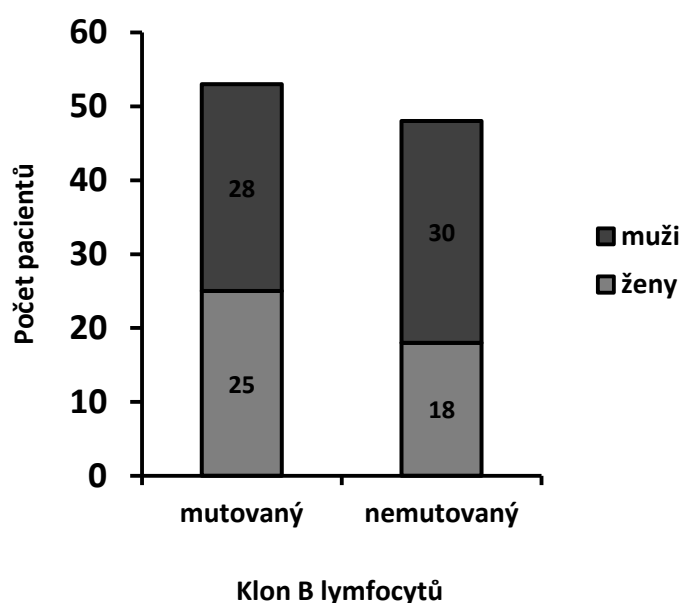


Obr. 9: Výskyt klonu B lymfocytů a mutací v porovnání s celkovým počtem pacientů.

Z grafu (Obr. 9) je patrné, že u většiny pacientů z celkového sledovaného souboru byl stanovením mutačního statusu nalezen mutovaný či nemutovaný klon B lymfocytů. Pozitivní nález mutací, které byly detekovány metodou FISH, byl zastoupen o něco méně. U 30 pacientů byly nalezeny oba prognostické faktory (mutovaný či nemutovaný klon B lymfocytů a zároveň i mutace). Rozdíl v počtu mužů a žen s oběma prognostickými faktory se od sebe příliš nelišil, celkem bylo zastoupeno 18 mužů a 12 žen.

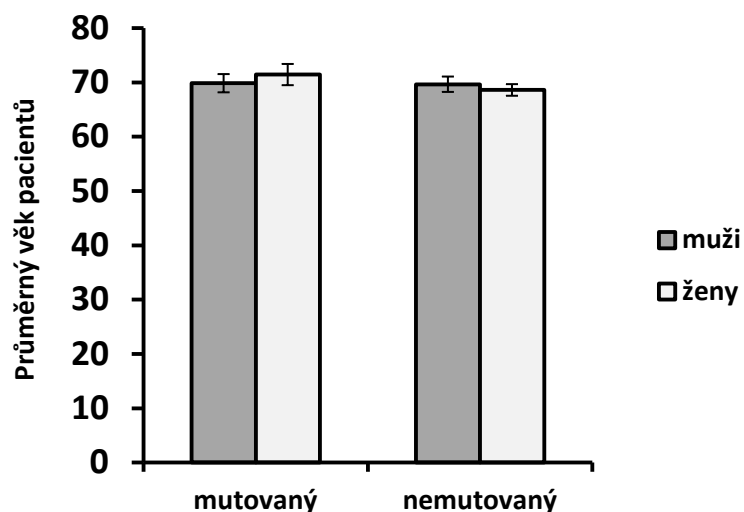
10.1 Mutační status CLL

U 101 pacientů diagnostikovaných CLL bylo provedeno vyhodnocení mutačního statusu. Celkem bylo zastoupeno 58 mužů a 43 žen. Průměrný všech věk pacientů činil $70 \pm 0,80$ let. Posléze byly porovnány skupiny pacientů, v jejichž leukemických buňkách došlo k somatické hypermutaci IGVH genů s pacienty, u kterých somatická hypermutace IGVH genů neproběhla. Byly tak získány informace o sekvenční homologii a prognóze pacienta.



Obr. 10: Počet pacientů s mutovaným a nemutovaným klonem B lymfocytů v závislosti na pohlaví.

Z grafu (Obr. 10) je vidět, že mutovaný klon B lymfocytů se sekvenční homologií menší než 98 % byl diagnostikován u 53 pacientů s CLL, což procentuálně činí 52 %. Lze tedy říci, že u více jak poloviny pacientů došlo k somatické hypermutaci IGVH genů, což značí příznivou prognózu a stabilní klinický průběh onemocnění. U zbylých 48 pacientů je přítomen nemutovaný klon B lymfocytů se sekvenční homologií větší nebo rovno 98 %. Procentuálně se jedná o 48 % z celkového počtu. Tito pacienti jsou prognosticky nepřízniví a jsou spojeni s agresivním průběhem onemocnění a horší odpovědí na terapii. Graf také ukazuje, že výskyt nemutovaného klonu B lymfocytů je častější u mužů než u žen. Počet mužů a žen s mutovaným klonem B lymfocytů se od sebe příliš neliší.



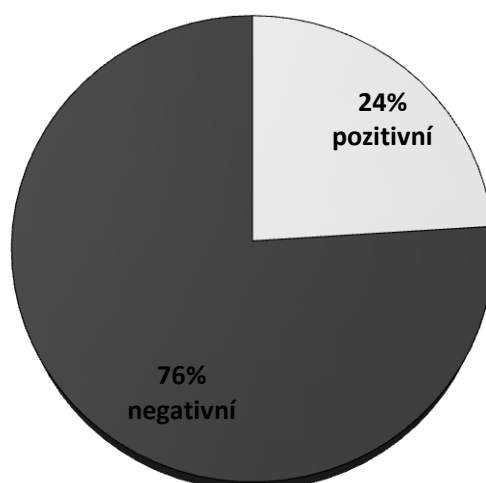
Obr. 11: Průměrný věk pacientů dle určitého klonu B lymfocytů v závislosti na pohlaví. $N(\text{mutovaný}) = 53$, $N(\text{nemutovaný}) = 48$. Znáznorněn SEM (střední chyba průměru).

Graf (Obr. 11) ukazuje, že průměrný věk pacientů s mutovaným a nemutovaným klonem B lymfocytů se od sebe příliš neliší. Průměrný věk mužů s mutovaným klonem B lymfocytů spojený s dobrou prognózou je $70 \pm 1,68$ let, u žen je to $71 \pm 1,95$ let. Průměrný věk mužů s nemutovaným klonem B lymfocytů, a tedy i agresivnějším průběhem onemocnění, činí $70 \pm 1,41$ let a průměrný věk žen $69 \pm 1,06$ let. Ačkoliv byl nemutovaný klon B lymfocytů nalezen u více mužů než žen, průměrný věk obou pohlaví se při stanovení diagnózy CLL od sebe lišil pouze nepatrně.

10.2 Frekvence mutací

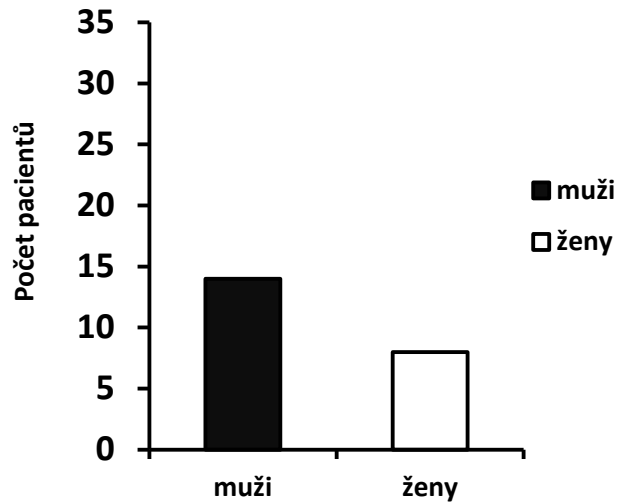
Dále bylo 90 pacientů s CLL podrobena detekci nejčastějších chromozomálních aberací. Jednalo se o 55 mužů a 35 žen. Průměrný věk všech pacientů činil $70 \pm$ let. Jednotlivé patologické klony mutací byly detekovány pomocí cytogenetického zhodnocení a molekulárně genetické metody FISH. Jednalo se převážně o delecii Igh, delecii p53, delecii ATM, delecii Rb-1 a trizomii 12. U některých pacientů byly přítomny i jiné než výše uvedené mutace.

10.2.1 Delece IgH



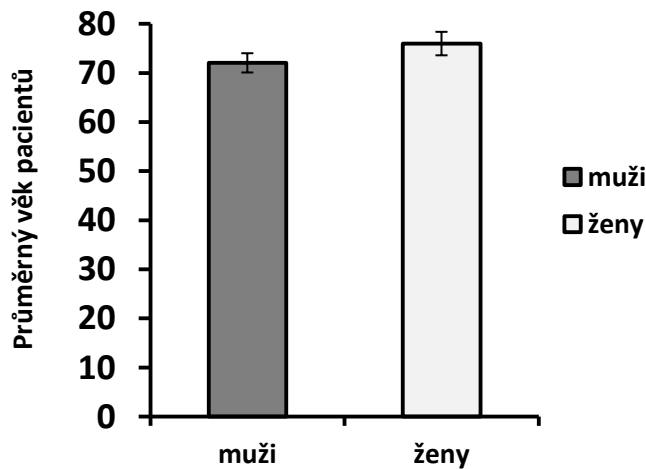
Obr. 12: Procentuální zastoupení pacientů s delecí IgH.

Z grafu (Obr. 12) lze vyčíst, že delece nebo zlom v lokusu IgH byl pozitivní u 24 % pacientů z celkového souboru. Převažující část pacientů měla negativní nález dané mutace.



Obr. 13: Počet pacientů s delecí IgH v závislosti na pohlaví.

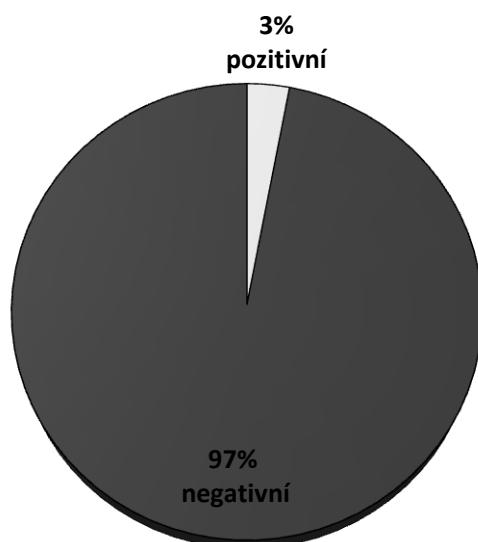
Z grafu (Obr. 13) lze vidět, že patologický klon s delecí Igh se vyskytuje u vyššího počtu mužů než žen. Delece IgH bude nejspíš postihovat častěji muže než ženy.



Obr. 14: Průměrný věk pacientů v závislosti na pohlaví. $N(\text{muži}) = 14$, $N(\text{ženy}) = 8$. Znázorněn průměr \pm SEM (střední chyba průměru).

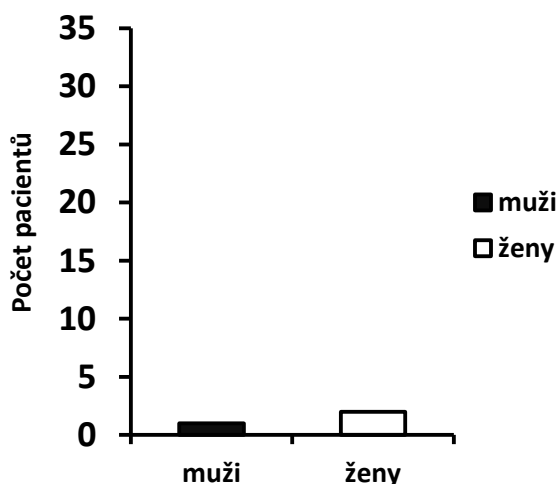
Z výše uvedeného grafu (Obr. 14) je vidět, že průměrný věk mužů s delecí Igh je $72 \pm 1,96$ let, u žen s delecí Igh je to $76 \pm 2,39$ let. Je tedy možné, že ženy postihuje tato mutace ve vyšším věku než muži.

10.2.2 Delece p53



Obr. 15: Procentuální zastoupení pacientů s delecí p53.

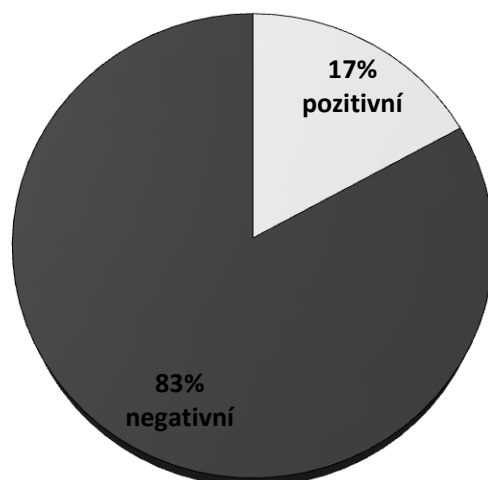
Z grafu (Obr. 15) je patrné, že delece lokusu 17p13 zahrnující gen TP53, byla negativní u většiny pacientů a pozitivní nález byl diagnostikován pouze u 3 % pacientů. Jedná se tak o procentuálně nejméně zastoupenou mutaci z celkového souboru zkoumaných mutací. Protože zastoupení počtu pacientů s pozitivním nálezem delece p53 bylo velmi malé, nelze určit průměrný věk pacientů dle pohlaví a SEM. Konkrétně se jednalo o jednoho muže ve věku 79 let a dvě ženy, kterým bylo 71 a 74 let.



Obr. 16: Počet pacientů s delecí p53.

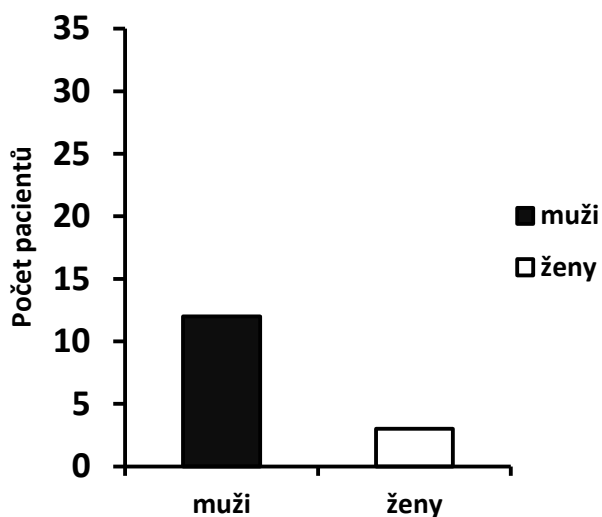
Z grafu (Obr. 16) můžeme vidět, že počet žen jen nepatrně převyšuje počet mužů. Delece p53 je jedinou mutací, ve které byl počet žen vyšší než počet mužů. Výsledky však mohou být zkreslené, protože byl zastoupen pouze jeden muž s pozitivním nálezem.

10.2.3 Delece ATM



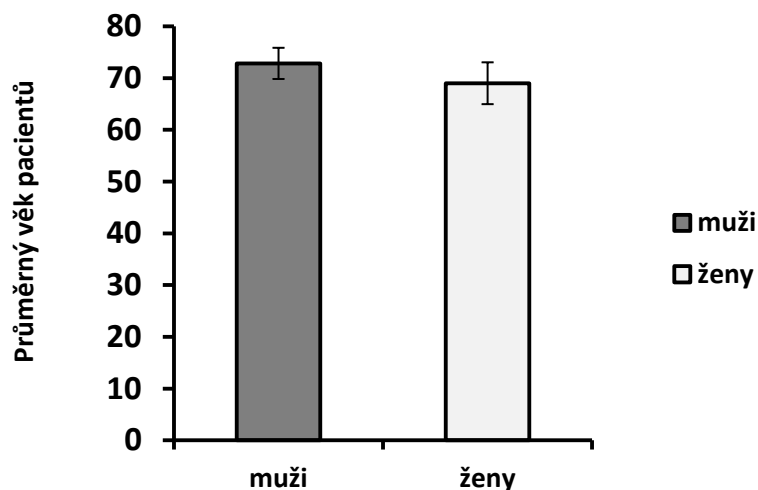
Obr. 17: Procentuální zastoupení pacientů s delecí ATM.

Graf na obrázku (Obr. 17) říká, že delece 11q22-23 zahrnující gen ATM, byla diagnostikována u 17 % pacientů a zbylých 83 % pacientů bylo negativních.



Obr. 18: Počet pacientů s delecí ATM v závislosti na pohlaví.

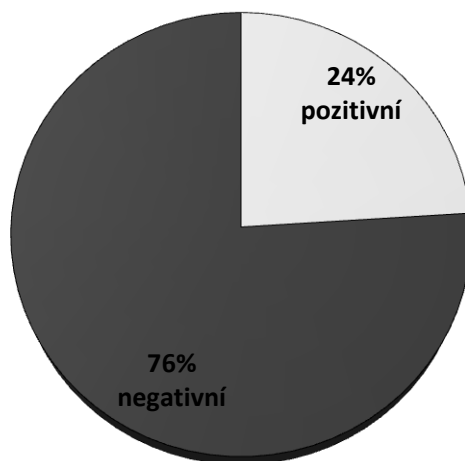
Z grafu (Obr. 18) je zřejmé, že počet mužů s pozitivním nálezem mutace ATM je výrazně vyšší než počet žen. Pozitivní nález patologického klonu s delecí ATM byl prokázán u 12 mužů a pouze u tří žen. Tato mutace bude pravděpodobně postihovat častěji muže než ženy.



Obr. 19: Průměrný věk pacientů s delecí ATM v závislosti na pohlaví. $N(\text{muži}) = 12$, $N(\text{ženy}) = 3$. Znáznorněn průměr \pm SEM (střední chyba průměru).

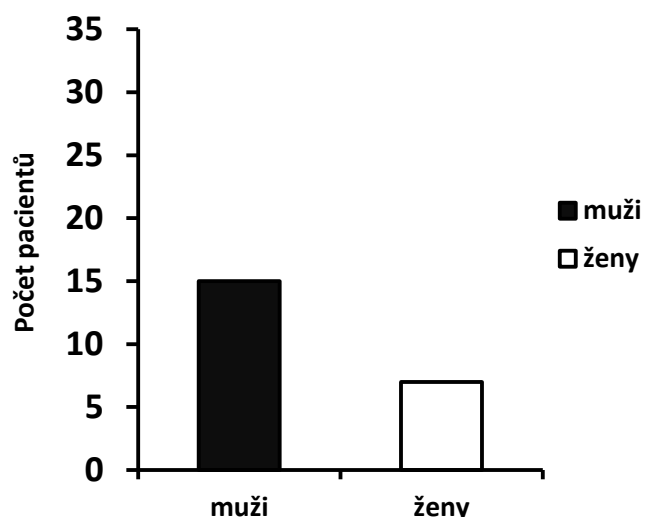
Z výše zmíněného grafu (Obr. 19) lze vidět, že průměrný věk mužů s delecí ATM je $73 \pm 3,01$ a průměrný věk žen činí $69 \pm 4,04$ let. Jedná se tak o jediný případ ze všech zkoumaných mutací, ve kterém je průměrný věk mužů o něco vyšší než u žen.

10.2.4 Trizomie 12



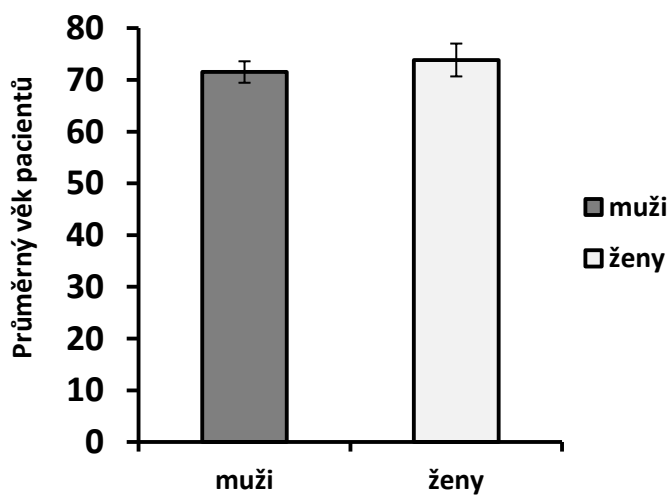
Obr. 20: Procentuální zastoupení pacientů s trizomií 12.

Z grafu (Obr. 20) plyne, že téměř čtvrtina pacientů byla pozitivních a byla u nich prokázána přítomnost trizomie 12. U zbylých 76 % pacientů nebyl prokázán pozitivní nález dané mutace.



Obr. 21: Počet pacientů s trizomií 12 v závislosti na pohlaví.

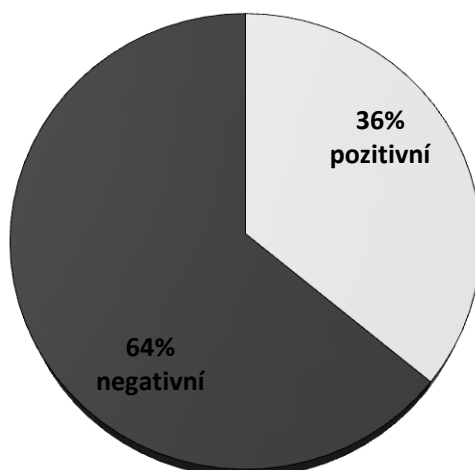
Z grafu (Obr. 21) můžeme vidět, že trizomie 12 se vyskytovala častěji u mužů než u žen. Mužů s pozitivním nálezem patologického klonu s trizomií 12 bylo o polovinu více než žen. Lze říci, že trizomie 12 postihuje častěji muže než ženy.



Obr. 22: Průměrný věk pacientů s trizomií 12 v závislosti na pohlaví. $N(\text{muži}) = 15$, $N(\text{ženy}) = 7$. Znáznorněn SEM (střední chyba průměru).

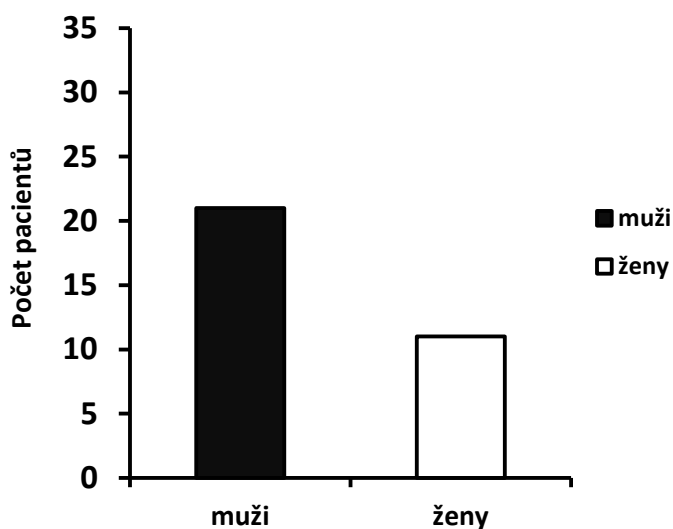
Graf (Obr. 22) znázorňuje, že průměrný věk mužů s trizomií 12 je $72 \pm 2,07$ let a průměrný věk žen činí $74 \pm 3,17$ let. Zajímavé je, že přestože se trizomie 12 vyskytuje častěji u mužů, průměrný věk mužů je nižší než u žen. Ženy tato mutace pravděpodobně postihuje ve vyšším věku než muže.

10.2.5 Delece Rb-1



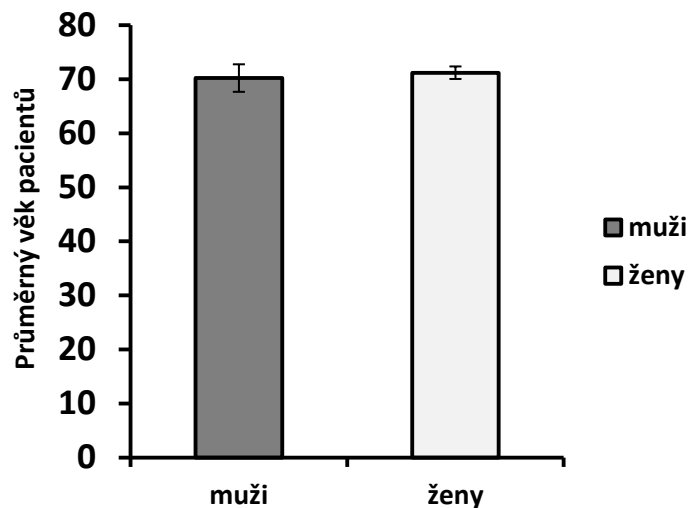
Obr. 23: Procentuální zastoupení pacientů s delecí Rb-1.

Na výše uvedeném grafu (Obr. 23) vidíme, že patologický klon s delecí Rb-1 byl prokázán u více než čtvrtiny pacientů. Z celkového souboru vyšetřených pacientů bylo pozitivních celkem 36 % nálezů. Jedná se o procentuálně nejvíce zastoupenou skupinu pacientů s pozitivním nálezem této mutace ze všech sledovaných mutací.



Obr. 24: Počet pacientů s delecí Rb-1 v závislosti na pohlaví.

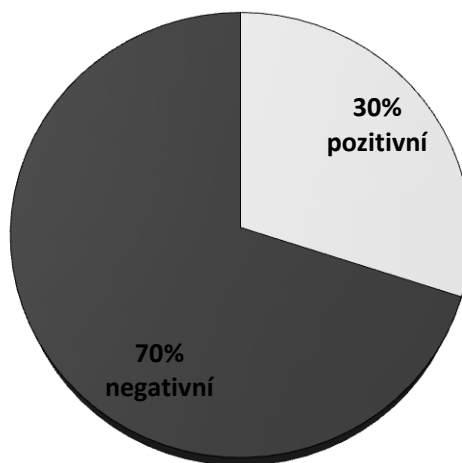
Z výše uvedeného grafu (Obr. 24) můžeme vidět, že patologický klon s delecí Rb-1 byl diagnostikován u 21 mužů a 11 žen. Je patrné, že u mužů byl výskyt delece Rb-1 skoro o polovinu častější než u žen.



Obr. 25: Průměrný věk mužů a žen s delecí Rb-1 v závislosti na pohlaví. N (muži) = 21, N(ženy) = 11. Znáznorněn průměr ± SEM (střední chyba průměru).

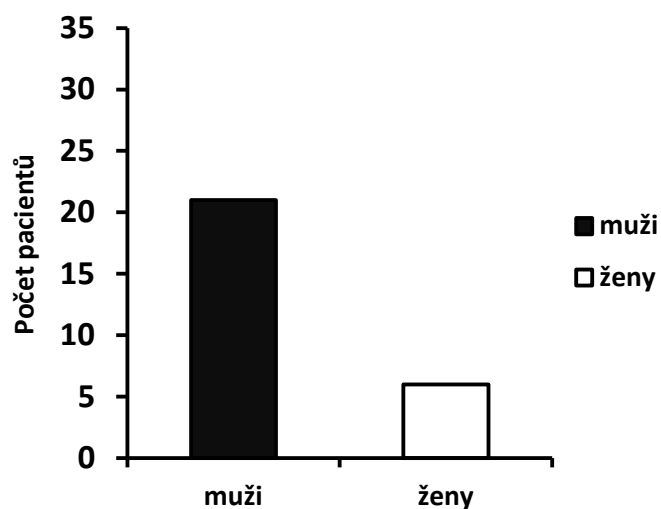
Graf na Obr. 25 říká, že průměrný věk žen byl o něco vyšší než u mužů. Průměrný věk mužů činí $70 \pm 2,54$ let a průměrný věk žen $71 \pm 1,15$ let.

10.2.6 Jiné mutace



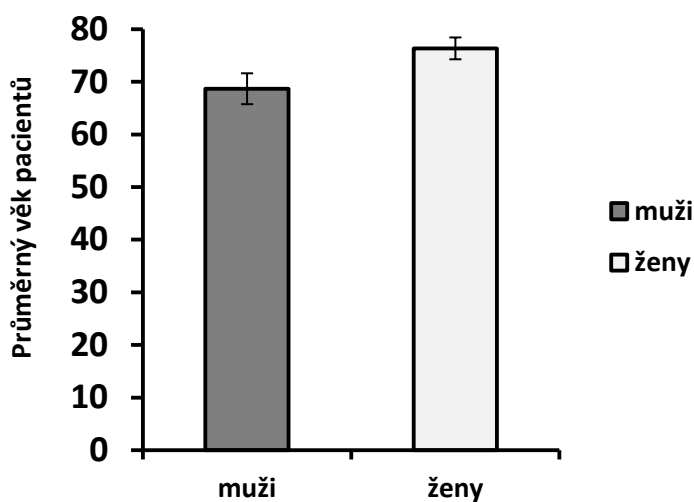
Obr. 26: Procentuální zastoupení pacientů s ostatními mutacemi.

Graf na obrázku (Obr. 26) říká, že 30% pacientů bylo pozitivních a kromě výše uvedených mutací u nich byly diagnostikovány i patologické klony s jinými mutacemi.



Obr. 27: Počet pacientů s jinými mutacemi v závislosti na pohlaví.

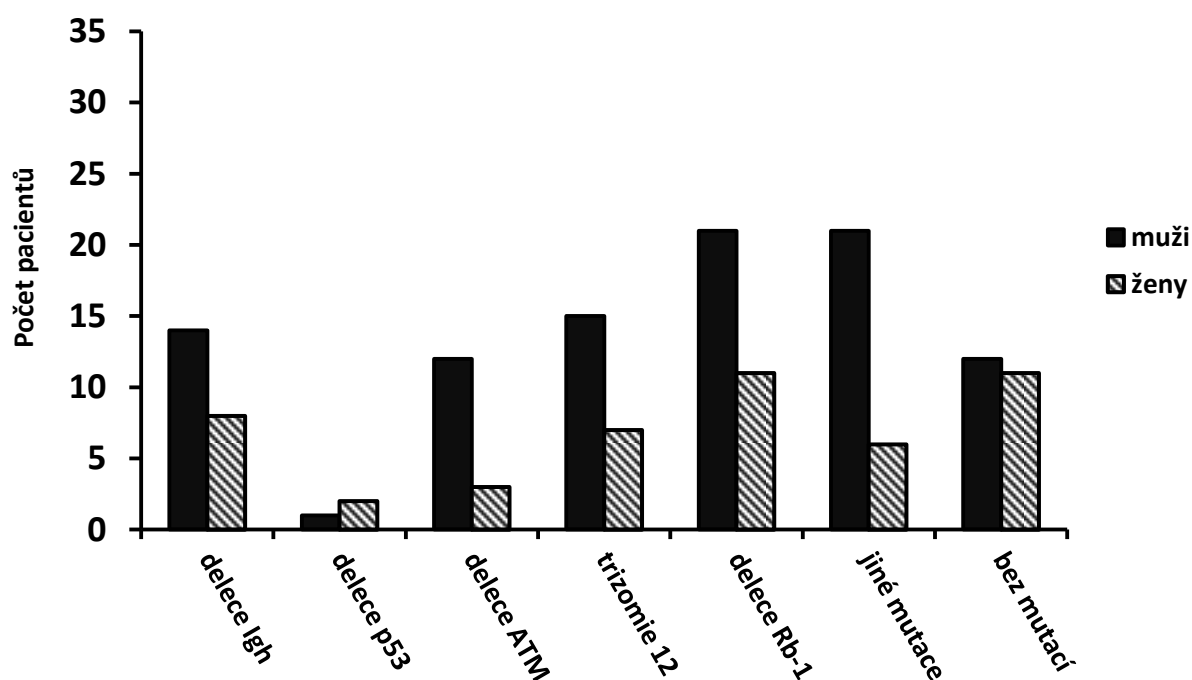
Z grafu (Obr. 27) je patrné, že u mužů byl daleko častější výskyt jiných mutací. Mužů bylo zastoupeno 21 a žen pouze 6. Lze říci, že muži jsou k jiným mutacím náchylnější.



Obr. 28: Průměrný věk pacientů s jinými mutacemi v závislosti na pohlaví. $N(\text{muži}) = 21$, $N(\text{ženy}) = 6$. Znáznorněn SEM (střední chyba průměru).

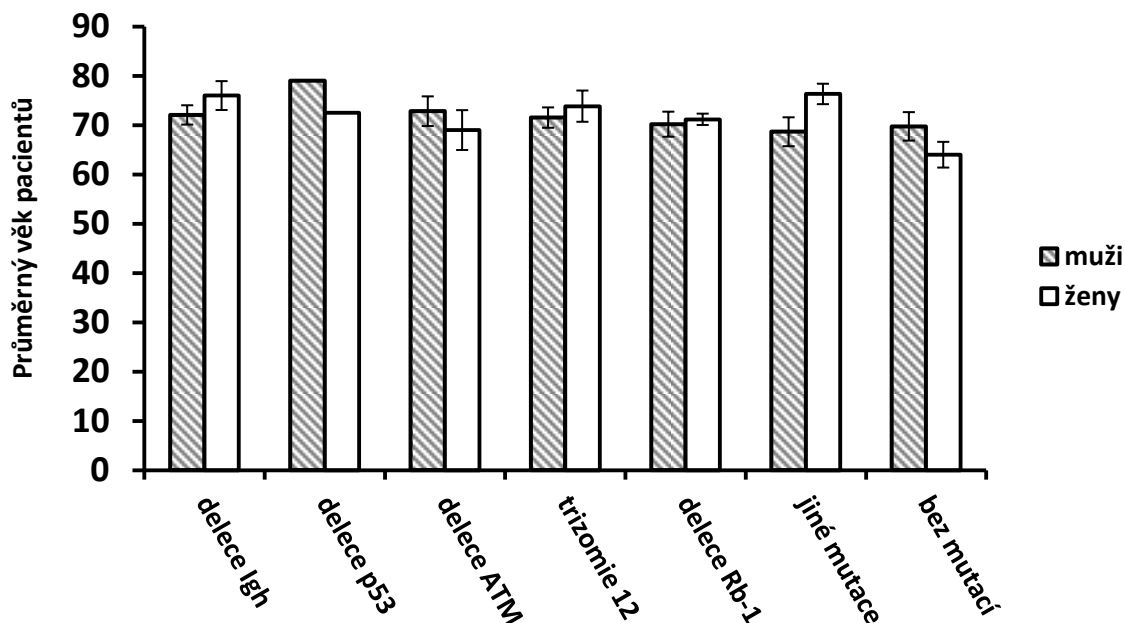
Na výše uvedeném grafu (Obr. 28) lze vidět, že průměrný věk mužů byl $69 \pm 2,93$ let a průměrný věk žen $76 \pm 2,07$ let. Přestože byl pozitivní nález ostatních mutací daleko častější u mužů než u žen, je zajímavé, že průměrný věk žen byl vyšší. U jiných mutací, než které byly sledovány, byl také prokázán nejvyšší rozdíl mezi průměrným věkem mužů a žen.

10.2.7 Souhrnné grafy



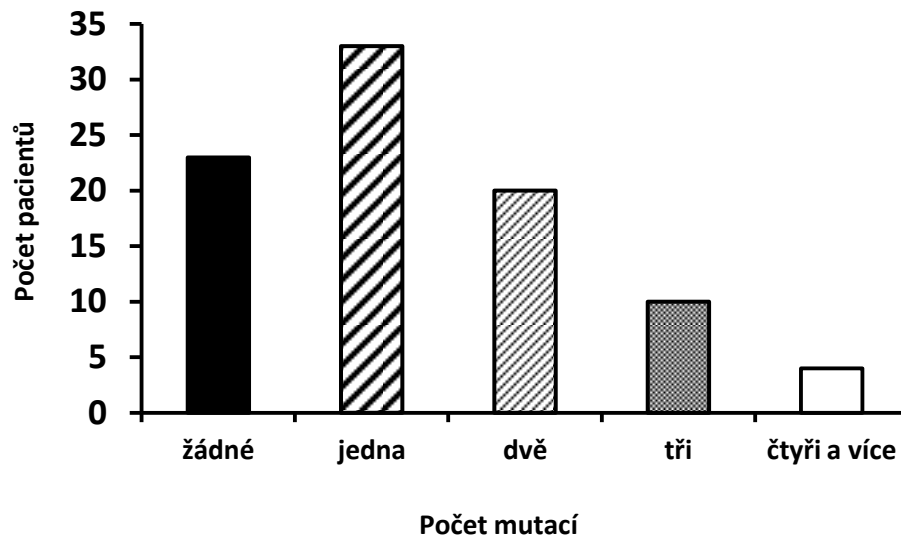
Obr. 29: Frekvence nejčastějších mutací u pacientů s CLL.

V následujícím grafu (Obr. 29) je zobrazena frekvence jednotlivých mutací u pacientů s diagnostikovanou CLL. Celkem bylo vyšetřeno 90 pacientů, z toho 56 mužů a 34 žen. V grafu jsou zahrnuti i ti pacienti, u kterých bylo provedeno cytogenetické zhodnocení chromozomálních aberací a molekulárně genetická metoda FISH, ale nebyla u nich detekována žádná mutace. Zároveň u některých pacientů byla zastoupena více než jedna mutace, a proto jsou zahrnuti ve všech kategoriích s pozitivním nálezem dané mutace. Z grafu (Obr. 17) je patrné, že nejvíce byla zastoupena delece Rb-1, u 32 pacientů a nejméně delece p53, pouze u tří pacientů. Lze také říci, že se chromozomální změny vyskytují častěji u mužů než u žen. Nejvyšší počet mužů byl delece Rb-1 a jiných mutací a nejnižší u delece p53.



Obr. 30: Průměrný věk pacientů s jednotlivými typy mutací a bez nich. N(delece IgH, muži) = 14, N(delece p53, muži) = 1, N(delece ATM, muži) = 12, N(trizomie 12, muži) = 15, N(delece Rb-1, muži) = 21, N(jiné mutace, muži) = 21, N(bez mutací, muži) = 12. N(delece IgH, ženy) = 8, N(delece p53, ženy) = 2, N(delece ATM, ženy) = 3, N(trizomie 12, ženy) = 7, N(delece Rb-1, ženy) = 11, N(jiné mutace, ženy) = 6, N(bez mutací, ženy) = 11. Znárodně SEM (střední chyba průměru).

Graf (Obr. 30) ukazuje, že průměrný věk pacientů s jednotlivými mutacemi se pohybuje okolo $70 \pm 1,01$ let. Nejvyšší průměrný věk byl prokázán vidět u delece p53 a činil $75 \pm 2,33$ let, což může být způsobeno nízkým počtem pacientů s pozitivním nálezem dané mutace. Průměrný věk mužů u delece p53, ze kterého by byla následně spočtena SEM, se nepodařilo určit, protože byl zastoupen pouze jeden pacient s pozitivním nálezem. Nejnižší průměrný věk se vyskytoval u pacientů bez mutací a činil $67 \pm 1,96$ let. Je možné, že výskyt mutací je spojen s vyšším věkem pacientů. Nejvyšší průměrný věk mužů byl zaznamenán u delece ATM, $73 \pm 3,01$ let a nejvyšší průměrný věk u žen s jinými mutacemi, $76 \pm 2,07$ let. Nejnižší průměrný věk mužů byl u pacientů s jinými mutacemi a činil $68 \pm 2,93$ let. Nejnižší průměrný věk žen měly pacientky bez mutací a činil $64 \pm 2,61$ let. Dále můžeme z grafu vidět, že u pacientů s jinými mutacemi se výrazně liší průměrný věk mužů a žen.



Obr. 31: Zastoupení pacientů dle počtu jednotlivých mutací.

Graf (Obr. 31) zobrazuje počet pacientů, u kterých bylo přítomno více typů mutací. Nejpočetnější skupinu představují pacienti s jednou nalezenou mutací, která byla detekována u 33 pacientů. O něco méně početnou skupinou jsou pacienti s dvěma přítomnými mutacemi. Nejméně početnou skupinu tvoří pacienti se čtyřmi a více mutacemi, kteří byli pouze čtyři. Jednalo se převážně o kombinaci patologického klonu s delecemi IgH, ATM, Rb-1 a jiné mutace. Maximální počet mutací, který byl nalezen u pacientů s CLL, bylo pět zastoupených mutací. U 23 pacientů nebyly prokázány žádné mutace.

11 Diskuze

Chronická lymfatická leukémie je nejčastějším zhoubným onemocněním v západní populaci, kde tvoří přibližně 25–30 % všech leukémií. V současné době se odhaduje více než 15 000 nově diagnostikovaných případů a přibližně 4500 úmrtí. Choroba postihuje převážně starší pacienty, tudíž se incidence choroby zvyšuje s rostoucím věkem. Medián věku při stanovení diagnózy se pohybuje mezi 67 a 72 lety (Hallek, 2017), což bylo prokázáno i v této práci, kdy průměrný věk celkového souboru 164 pacientů s diagnózou CLL činil $70 \pm 0,73$ let. Byrd *et al.*, 2004, uvádí, že ačkoli CLL postihuje převážně starší jedince, přibližně třetina pacientů s CLL má při stanovení diagnózy méně než 60 let. V této práci bylo nalezeno 16 pacientů, kteří byli mladší 60 let. Jedná se přibližně o 10 % z celkového souboru. Nejmladším pacientem byl muž ve věku 37 let a naopak nejstarším 91letá žena. Celkem bylo zastoupeno 91 mužů a 63 žen, což potvrzuje studii Strati *et al.*, 2018, která uvádí, že muži trpí onemocněním častěji než ženy, v poměru 1,5–2 : 1.

Cílem této práce bylo zjistit frekvenci nejčastějších mutací u pacientů s CLL. Kromě klinického stagingu dle Raie a Bineta byla identifikována řada prognostických faktorů, které předpovídají OS pacientů (Pflug *et al.*, 2014). Tyto markery jsou založeny na genetických, fenotypových nebo molekulárních charakteristikách CLL B buněk (Cornet *et al.*, 2015). Mezi tzv. nové prognostické faktory patří zejména mutační stav IGVH a cytogenetické abnormality (Smolewski *et al.*, 2013). Studie Autore *et al.*, 2018, uvádí, že chromozomální abnormality jsou detekovány pomocí molekulárně genetické metody FISH až u 80 % pacientů s CLL. Z 90 pacientů s CLL, kteří byli podrobeni detekci mutací, byla u 67 z nich prokázána přítomnost patologického klonu s alespoň jednou mutací, což představuje 74 %. Je důležité zmínit, že chromozomální odchylky se mohou vyskytovat buď jako jediná chromozomální abnormalita, nebo mohou koexistovat s jinými změnami počtu a strukturou chromozomů, což vede ke složitějším změnám karyotypu (Kiefer *et al.*, 2012). U 34 pacientů byl přítomen pozitivní nález více jak jedné mutace. Procentuálně se jedná o 38 % ze sledovaného souboru. Normální karyotyp 46XX a 46XY je zaznamenán pouze v 18 % případů CLL (Andreieva *et al.*, 2017). V práci bylo zastoupeno 23 pacientů bez mutací, kteří vykazovali normální karyotyp. Výsledky jsou o něco vyšší, než udává studie Andreieva *et al.*, 2017, a jednalo se o 25 % pacientů. Důvodem, proč bylo množství pacientů s normálním karyotypem vyšší, může být menší počet vyšetřovaných mutací, a tedy i zdánlivě vyšší počet pacientů bez mutací.

Zajímavé je, že počet mužů bez mutací, kterých bylo 12, se jen nepatrně lišil od počtu 11 žen. Očekávalo se, že žen bez mutací bude o dost více než mužů, protože u nich výskyt onemocnění není tak častý. Průměrný věk pacientů s mutacemi činil $70 \pm 1,01$ a bez nich, $67 \pm 1,96$ let. Výskyt mutací bude pravděpodobně spojen s vyšším věkem pacientů.

K nejčastějším chromozomálním abnormalitám, které jsou u pacientů s CLL identifikovány pomocí metody FISH, patří částečné ztráty jednoho chromozomu, jako např. delece 11q, 17p a 13q nebo zisk celého chromozomu, např. trizomie 12 (Rahimi *et al.*, 2017).

Delece 17p13, zahrnující gen TP53, patří mezi vzácné mutace, která se vyskytuje přibližně u 5–7 % všech pacientů s CLL a její frekvence se s progresí onemocnění významně zvyšuje (Hus, Rolinskí, 2015). Patologický klon s delecí p53 vykazoval v práci o něco nižší procentuální zastoupení a byl diagnostikován pouze u 3 % pacientů. Jedná se o procentuálně nejméně zastoupenou delecí z celkového souboru pozorovaných mutací, což potvrzuje předpoklad Hus, Rolinskí, 2015, že se delece 17p13 s defektem genu p53 u pacientů s CLL vyskytuje velmi vzácně. Zajímavé je, že počet mužů je zde nižší než počet žen. Důvodem však může být malé množství pacientů, u kterých byla detekována daná mutace. Pozitivní nález delece p53 byl prokázán u dvou žen a pouze u jednoho muže. Z tohoto důvodu se nepodařilo určit průměrný věk pacientů a SEM.

Delece 11q22-23, zahrnující gen ATM, postihuje 5–20 % pacientů (Puiggros *et al.*, 2014). Tato delece byla napočítána u 15 pacientů, což představuje 17 %. Hodnota odpovídá studii Puiggros *et al.*, 2014. U této delece bylo zastoupeno výrazně více mužů než žen. Mužů s delecí ATM bylo 12 a ženy pouze tři.

Delece lokusu 13q14, zahrnující gen Rb-1, je jednou z nejčastějších chromozomálních aberací CLL a vyskytuje se zhruba u 50 % pacientů (Ouillette *et al.*, 2011). Výsledky této práce jsou odlišné v porovnání s údaji ve studii Ouillette *et al.*, 2011. Z celkového souboru sledovaných mutací se sice jednalo o nejpočetněji zastoupenou cytogenetickou abnormalitu, ale přítomnost patologického klonu s pozitivní delecí Rb-1 byla prokázána pouze u 36 % pacientů. Důvodem může být nízký počet pacientů v celkovém sledovaném souboru.

Trizomie 12 je třetí nejčastější cytogenetickou abnormalitou CLL a vyskytuje se u 10–20 % pacientů (Puiggros *et al.*, 2014). V práci byla trizomie 12 třetí nejčastější mutací společně s delecí Igh a pozitivní nález byl prokázán u 22 pacientů, což představuje 24 %. Výsledek trochu liší od studie Puiggros *et al.*, 2014. Mužů s trizomií 12 bylo také o polovinu více než žen.

Práce se zabývala i jinými mutacemi, než výše uvedenými. Jiné mutace byly přítomny u 27 pacientů, což představuje 30 % z celkového počtu. Objevila se zde široká škála různých cytogenetických abnormalit, jako např. delece 6q21, delece q raménka chromozomu 14, trizomie chromozomu 18 a 19 a další patologické přestavby chromozomů. Delece dlouhého raménka chromozomu 6 se u CLL vyskytuje při relativně nízké frekvenci (3–6 %) a je spojena s dobrou prognózou (Dalsass *et al.*, 2013). V této práci byla pozitivní u 3 % pacientů, a odpovídá tedy studii Dalsass *et al.*, 2013. Za zmínku zde stojí výrazně odlišný průměrný věk pacientů, který u mužů činil $68 \pm 2,93$ let a u žen $76 \pm 2,07$ let. Mužů s jinými mutacemi (21), bylo daleko více než žen (6), což může být důvod, proč se průměrný věk obou pohlaví v této skupině tak výrazně lišil.

Žádná ze sledovaných mutací nebyla zastoupena u více jak poloviny pacientů. U většiny pacientů bylo prokázáno vyšší zastoupení mužů než žen, což se opět shoduje se studií Strati *et al.*, 2018, že se CLL vyskytuje častěji u mužů. Výjimkou byla pouze delece p53, ve které byly zastoupeny dvě ženy a jeden muž. Nejvyšší rozdíl týkající se počtu pacientů v závislosti na pohlaví byl prokázán u pacientů s jinými mutacemi. Naopak u pacientů bez mutací se nejednalo o velké rozdíly v počtu mužů a žen. Mužů bez mutací bylo pouze o jednoho více než žen, kterých bylo 11.

U většiny sledovaných mutací (kromě delece ATM a pacientů bez mutací) také průměrný věk žen převyšoval průměrný věk mužů. Z toho lze usoudit, že muži jsou postiženi mutacemi v nižším věku než ženy. Výjimkou je delece ATM, u které byl průměrný věk mužů $72 \pm 3,01$ let a průměrný věk žen $69 \pm 4,04$ let. Možné je, že výsledky mohou být zkreslené, protože jsou ovlivněny nízkým počtem žen s pozitivním nálezem dané mutace.

Dále byla práce zaměřena na přítomnost sekvenční homologie s mutovaným či nemutovaným klonem B lymfocytů. Téměř 50–70 % pacientů s CLL vykazuje známky hypersomatické mutace ve variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinu (Tari *et al.*, 2018). V této práci bylo zastoupeno celkem 53 pacientů s mutovaným klonem B lymfocytů, jejichž sekvenční homologie byla menší než 98 %. Jedná se o 52 % z celkového souboru a výsledek se shoduje s hodnotou, kterou udává ve své práci Tari *et al.*, 2018. Lze tedy říci, že u více jak poloviny pacientů došlo k somatické hypermutaci IGVH genů, což značí příznivou prognózu a stabilní klinický průběh onemocnění. Nemutovaný klon B lymfocytů se sekvenční homologií větší než 98 % byl přítomen u 48 pacientů, což představuje 48 % z celkového souboru. Tito pacienti jsou spojeni s agresivnějším průběhem onemocnění a horšími výsledky v porovnání s pacienty s mutovaným klonem B lymfocytů (Moreno, Montserrat, 2010). Průměrný věk pacientů s nemutovaným a s mutovaným klonem

B lymfocytů se od sebe lišil pouze nepatrně. Výsledky však ukázaly, že počet žen s nemutovaným klonem B lymfocytů je menší než počet s mutovaným klonem B lymfocytů. To by mohlo naznačovat, že u žen je somatická hypermutace IGVH častější, a proto by průběh jejich onemocnění mohl být spojen s lepší prognózou.

Pro tuto práci byl vybrán nízký počet pacientů. Pro lepší výsledky by bylo vhodné získat pro výzkum více pacientů s CLL a do budoucna se podrobněji zabývat biologickým chováním choroby v závislosti na jednotlivých chromozomálních změnách, více se zaměřit na rizikovitost choroby a na to, jak mutace ovlivňují celkové přežití pacientů.

12 Závěr

- Cílem práce bylo zjistit frekvence nejčastějších mutací u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií. Tento cíl byl zcela splněn. Mezi nejčastější mutace detekované u pacientů s CLL patří delece IgH, delece p53, delece ATM, delece Rb1, trizomie 12. Pozitivní nález alespoň jedné mutace mělo 67 pacientů. U některých byla objevena více jak jedna mutace. Nejpočetněji zastoupenou mutací byla delece 13q14, s defektem genu Rb-1, u 36 % pacientů a nejméně početnou mutací delece 17p13, s defektem genu P53, u 3 % pacientů.
- Dále byly dány jednotlivé podcíle práce:
 - Prvním podcílem bylo zhodnocení mutačního statusu u CLL, což bylo splněno. Mutovaný klon B lymfocytů byl nalezen u 52 % pacientů a nemutovaný klon u 48 % pacientů s diagnostikovanou CLL. Mutovaný klon B lymfocytů je spojen s příznivou prognózou onemocnění a nemutovaný klon B lymfocytů s nepříznivou prognózou. Žen s nemutovaným klonem B lymfocytů bylo o něco méně než mužů. Průměrný věk pacientů v závislosti na klonu B lymfocytů se od sebe příliš nelišil.
 - Dále byl splněn podcíl určení počtu pacientů s jednotlivými mutacemi a dle pohlaví. Nejvyšší počet mužů byl u delece Rb-1 a jiných mutací, nejnižší u delece p53. Nejvyšší počet žen byl zastoupen u delece Rb-1 a nejnižší u delece p53. Většina mutací, s výjimkou delece p53, se vyskytovala častěji u mužů než u žen.
 - Posledním podcílem bylo porovnání průměrného věku pacientů s jednotlivými mutacemi a dle pohlaví, což bylo také splněno. Nejvyšší průměrný věk byl prokázán u mužů s delecí ATM, a činil $73 \pm 3,01$ let. Nejvyšší průměrný věk měly ženy s jinými mutacemi, $76 \pm 2,07$ let. Nejnižší průměrný věk měli muži s jinými mutacemi, $69 \pm 2,93$ let a ženy s delecí ATM, $69 \pm 4,04$ let.

13 Seznam použité literatury

Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J. (2008). Hematologie. Přehled maligních hematologických nemocí. Praha: Grada, ISBN: 978-80-247-2502-4.

Adam, Z., Vorlíček, J. (2001). Hematologie II. Přehled maligních hematologických nemocí. Praha: Grada, ISBN: 80-247-0116-2.

Amaya-Chanaga, C.I., Rassenti, L.Z. (2016). Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: clinical applications and prognostic markers. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 29: 79–89.

Anděl, M., Kozák, T. (2001). Vnitřní lékařství díl IIIb. Hematologie. Praha: Karolinum, ISBN: 80-246-0215-6.

Andreieva, S.V., Korets, K.V., Skorokhod, I.M., O. E. Ruzhinska (2017). Chromosomal abnormalities in bone marrow cells in relapse of chronic lymphocytic leukemia. *The Nucleus*, 3: 155–161.

Atyabi, F., Zahir, F., Khonsari, F., Shafiee, A., Mottaghitlab, F. (2017). Combination therapy of macromolecules and small molecules: approaches, advantages and limitations. *Nanostructures for Cancer Therapy*, 21: 541–561.

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.

Awan, F.T., Byrd, J.C. (2018). Chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, 20: 5869–5874.

Bartošík, M., Jiráková, L. (2018). Current methods of microRNA analysis. *Klinická Onkologie*, 31: 93–101.

Belada, D. (2008). Monoklonální protilátky v léčbě lymfomů, farmakoterapie. *Remedia*, 18: 416–423.

Bergmann, M., Wendtner, C.M. (2015). Chronic lymphatic leukemia. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 140: 479–82.

Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S. (1995). Williams hematology. New York: McGraw-Hill, ISBN: 978-0070-703-865.

Boelens, J., Lust S., Vanhoecke, B., Offner, F. (2009). Chronic lymphocytic leukaemia. *Anticancer research*, 29: 605–616.

Borthakur, G., Bryan, J. (2010). Role of rituximab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 7: 1–11.

Brychtová, Y., Panovská, A., Doubek, M. (2016). Chronická lymfatická leukemie. Informace pro pacienty a jejich blízké. Praha: Kmen, ISBN: 978-80-906212-5-1.

Buka, D., Dvořák, J., Sitorová, V., Richter, I., Sirák, I., Zapletal, R., Donátová, Z., Hatlová, J., Vobořil, R. (2016). Prognostický význam exprese proteinu p53 u pacientů léčených pooperační adjuvantní radioterapií pro adenokarcinom rekta. *Onkologie*, 10: 228–230.

Bullrich, F., Rasio, D., Kitada, S., Starostik, P., Kipps, T., Keating, M., Albitar, M., Reed, J.C., Croce, C.M. (1999). Advances in brief ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research*, 59: 24–27.

Byrd, J.C., Stilgenbauer, S., Flinn, I.W. (2004). Chronic lymphocytic leukemia. *American Society of Hematology Education Program*, 2004: 163–183.

Cornet, E., Debliquis, A., Rimelen, V., Civic, N., Docquier, M., Troussard, X., Drénou, B., Matthes, T. (2015). Developing molecular signatures for chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE*, 10: 1–19.

Čihák, R. (2011). Anatomie 1. Praha: Grada, ISBN: 978-80-247-3817-8.

Dalsass, A., Mestichelli, F., Ruggieri, M., Gaspari, P., Pezzoni, V., Vagnoni, D., Angelini, M., Angelini, S., Bigazzi, C., Falcioni, S., Troiani, E., Alesiani, F., Catarini, M., Attolico, I., Scortechini, I., Discepoli, G., Galieni, P. (2013). 6q deletion detected by fluorescence in situ hybridization using bacterial artificial chromosome in chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Haematology*, 91: 10–19.

Delgado, J., Santacruz, R., Baumann, T., Montserrat, E. (2013). New developments in chronic lymphocytic leukaemia diagnosis. *European Oncology & Haematology*, 9: 114–8.

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. *New England Journal of Medicine*, 343: 1910–1916.

Doubek M., Špaček M., Pospíšilová Š., Jarošová M., Papajík T., Urbanová R., Šimkovič M., Lysák D. Brejcha M., Smolej L. (2018). Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukémie (CLL) – 2018. *Transfúze a hematologie dnes*, 3: 208–220.

Eldridge, L. (2019). Why are Tumor Suppressor Genes Important in Cancer? Function, Abnormalities, and Role in Cancer. In: *Verywell health* [online]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/what-are-tumor-suppressor-genes-2249209>.

Fečková-Mihályová, J., Ďuraš, J., Zuchnická, J., Kaščák, M., Hájek, R. (2016). Ibrutinib v hematologii. *Klinická farmakologie a farmacie*, 30: 8–14.

Ferrarini, M., Cutrona, G., Neri, A., Morabito, F. (2012). Prognostic factors in CLL. *Leukemia supplements*, 1: 29–30.

Friedmann, B. (1994). Hematologie v praxi. Praha: Galén, ISBN: 80-85824-05-1.

Giudice, D.I., Rossi, D., Chiaretti, S., Marinelli, M., Tavoraro, S., Gabrielli, S. S., Laurenti, L., Marasca, R., Rasi, S., Fangazio, M., Guarini, A., Gaidano, G., Foà, R. (2012). NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*, 97: 437–441.

Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Asikanius, E., Owen, C.J., de la Serna, J., Illmer, T., Opat, S., Eichhorst, B., Wendtner, C.M, Chagorova, T., Dilhuydy, M.S., Samoylova, O., Kreuzer, K.A., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Langerak, A.W., Ritgen, M., Kneba, M., Asikanius, E., Humphrey, K., Wenger, M., Hallek, M. (2014). Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *New England Journal of Medicine*, 370: 1101–1110.

Grygalewicz, B., Woroniecka, R., Rygier, J., Borkowska, K., Rzepecka, I., Łukasik, M., Budziłowska, A., Rymkiewicz, G., Błachnio, K., Nowakowska, B., Bartnik, M., Gos, M., Pieńkowska-Grela, B. (2016). Monoallelic and biallelic deletions of 13q14 in a group of CLL/SLL patients investigated by CGH haematological cancer and SNP array (8x60K). *Molecular Cytogenetics*, 9: 1–17.

Guarini, A., Marinelli, M., Tavoraro, S., Bellacchio, E., Magliozzi, M., Chiaretti, S., De Propris, M.S., Peragine N., Santangelo, S., Paolini, F., Nanni, M., Del Giudice I., Mauro, F.R., Torrente, I., Foà, R. (2012). Atm gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica*, 97: 47–55.

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

Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology*, 92: 946–965..

Hallek, M., Cheson, B., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R, Kipps, T.J. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the international workshop on chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 111: 5446–5457.

Hardwick, J.M., Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5: 8–22.

Harper, T.A. (1974). The peripheral blood film. London: Butterworth-Heinemann, ISBN: 407-76001-6.

Hus, I., Roliński, J. (2015). Current concepts in diagnosis and treatment of chronic lymphocytic Leukemia. *Współczesna Onkologia*, 19: 361–367.

Cheson, B.D., Leoni L. (2011). Bendamustine: mechanism of action and clinical data. *Clinical Advantages in Hematology & Oncology*, 9: 1–11.

Chiorazzi, N., Rai, K.R., Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 352: 804–815..

Jiang, Y., Chen, H.C., Su, X., Thompson, P.A., Liu, X., Do, K.A., Wierda, W., Keating, M.J., Plunkett, W. (2016). ATM function and its relationship with ATM gene mutations in chronic lymphocytic leukemia with the recurrent deletion (11q22.3-23.2). *Blood Cancer Journal*, 6: 457–465.

Kaur, P. (2018). Chronic lymphocytic leukemia. Basilej: Springer International Publishing AG, ISBN: 978-3-319-70602-3.

Kay, N.E., Shanafelt, T.D. (2007). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2: 49–55.

Kiefer, Y., Schulte, C., Tiemann, M., Bullerdiek, J. (2012). Chronic lymphocytic leukemia associated chromosomal abnormalities and miRNA deregulation. *Application of Clinical Genetics*, 5: 21–28.

Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., O'Brien, S., Gribben, J., Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*, 3: 160–196.

Klener, P., Klener, P., jr. (2010). Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha: Grada Publishing, ISBN: 978-80-247-2808-7.

Kotala, V., Uldrijan, S., Nenutil, R., Vojtěšek, B. (2002) Protein P53 a protinádorová terapie. *Klinická Onkologie*, 15: 98–101.

Kozák, T. (2008). Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie*, 2: 156–162.

Lebien, T.W., Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112: 1570–1580.

Lysák, D., Schwarz, J. (2015). Treatment of chronic lymphocytic leukemia with TP53 aberrations. *Klinická Onkologie*, 28: 39–44.

Majid, A., Tsoulakis, O., Walewska, R., Gesk, S., Siebert, R., Kennedy, D.B.J., Dyer, M.J.S. (2008). BCL2 expression in chronic lymphocytic leukemia: lack of association with the BCL2 – 938A > C promoter single nucleotide polymorphism. *Blood*, 111: 874–877.

Maurer, C., Hallek, M. (2013). Chronische lymphatische Leukämie. *Deutsche medizinische wochenschrift*, 138: 2153–2166.

Mayer, J., Starý J. (2002). Leukémie. Praha: Grada, ISBN: 80-7169-9918.

Moreno, C., Montserrat, E. (2010). Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: what's ready for prime time use? *Haematologica*, 95: 12–15.

Motyčková, M., Žák, P., Vroblová, V., Andrýs, C., Belada, D., Malý, J., Smolej, L. (2011). Prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie. *Vnitřní lékařství*, 57: 847–857.

Mráz, M., Doubek, M., Mayer, J. (2013). Inhibice signalizace B buněčným receptorem: první cílená léčba u chronické lymfocytární leukemie a dalších B buněčných lymfomů. *Klinická Onkologie*, 26: 179–185.

Navrkalová, V., Kantorová, B., Jarošová, M., Pospíšilová, Š. (2015). Molecular prognostic markers and their clinical relevance in chronic lymphocytic Leukemia. *Klinická Onkologie*, 28: 6–15.

Nemeth, M.J., Bodine, D.M. (2007). Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Research*, 17: 746–758.

Novák, J. (2016) MikroRNA v kardiologii, přehled pro klinickou praxi. *Kardiologická revue, Interní medicína*, 18: 258–267.

Obrtlíková, P., Urbanová, R. (2015). Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia in 2015. *Klinická Onkologie*, 28: 22–29.

Opferman, J.T., Kothari, A. (2018). Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death and Differentiation*, 25: 37–45.

Österborg, A. (2010). Ofatumumab, a human anti-CD20 monoclonal antipody. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10: 439–449.

Ouillette, P., Collins, R., Shakhan, S., Li, J., Li, C., Shedden, K., Malek, S.N. (2011). The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, 17: 6778–6790.

Palásek, I., Doubek, M., Vorlíček, J. (2003). Chronická lymfatická leukémie. Informace pro pacienty a jejich blízké. Praha: Roche, ISBN: 80–20–3272–3.

Panovská, A., Doubek, M. (2013). Chronická lymfocytární leukemie, diagnostika a léčba. *Onkologie*, 7: 117–120.

Papaliagkas, V., Anagianaki, A., Anogianakis, G., Ilonidis, G. (2007). The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. *Hippokratia*, 11: 108–113.

Parikh, S.A., Shanafelt, T.D. (2016). Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology*, 43: 233–240.

Parker, T.L., Strout, M.P. (2011). Chronic lymphocytic leukemia: prognostic factors and impact of treatment. *Discovery Medicine*, 11: 115–23.

Paull, T.T. (2015). Mechanisms of ATM activation. *Annual Review of Biochemistry*, 84: 711–38.

Pekarsky, Y., Balatti, V., Croce, C.M. (2018). BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment. *Cell Death and Differentiation*, 25: 21–26.

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.

Puiggros, A., Blanco, G., Espinet, B. (2014). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Research International*, 2014: 1–13.

Rahimi, H., Sadeghian, M.H., Keramati, M.R., Jafarian, A.H., Shakeri, S., Shams, S. F., Motamedi, N., Sheikhi, M., Ayatollahi, H. (2017). Cytogenetic abnormalities with interphase FISH method and clinical manifestation in chronic lymphocytic leukemia patients in North-East of Iran. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 11: 217–224.

Rodrigues, C.A., Gonçalves, M.V., Ikoma, M.R., Lorand-Metze, I., Pereira, A.D., Farias, D.L., Chauffaille, M.L., Schaffel, R., Ribeiro, E.F., Rocha, T.S., Buccheri, V., Vasconcelos, Y., Figueiredo, V.L., Chiattonne, C.S., Yamamoto, M. (2016). Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the brazilian group of chronic lymphocytic leukemia. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 38: 346–357.

Roosbroeck, K.V., Calin, G.A. (2016). MicroRNAs in CLL: miRacle or miRage for prognosis and targeted therapies? *Seminars in Oncology*, 43: 209–214.

Rosati, E., Baldoni, S., Falco, D.F., Papa, D.B., Dorillo E., Rompietti, C., Albi, E., Falzetti, F., Ianni D.I, Sportoletti, P. (2018). NOTCH1 aberrations in chronic lymphocytic Leukemia. *Frontiers in Oncology*, 8: 201–229.

Rozenberg, G. (2011). Cases in microscopic haematology. Marrickville: Elsevier Australia, ISBN: 978-0729540926.

Rozman, C., & Montserrat, E. (1995). Chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 333: 1052–1057.

Rozovski, U., Keating, J. M., Estrov, Z. (2018). Why is the immunoglobulin heavy chain gene mutation status a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia? *Acta Haematologica*, 140: 51–54.

Sachdeva, M., Dhingra, S. (2015). Obinutuzumab: A FDA approved monoclonal antibody in the treatment of untreated chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 5: 54–57.

Salles, G., Barrett, M., Foà, R., Maurer, J., O'Brien, S., Valente, N., Wenger, N., Maloney, D. G. (2017). Rituximab in B-Cell hematologic malignancies: a review of 20 years of clinical experience. *Advances in therapy*, 34: 2232–2273.

Scarfò, L., Ferreri, A.J., Ghia, P. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 104: 169–182.

Shimizu, S., Masashi, N., Yoshihide, T. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399: 483–487.

Simmons, H. (2018). What is TP53? In: *News Medical Life Sciences* [online]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-TP53.aspx>.

Slíva, J., Votava, M. (2010). Farmakologie. Praha: Triton, ISBN: 978-80-7387-42-47.

Smolej, L. (2010). Současné možnosti léčby chronické lymfocytární leukemie. *Remedia*, 20: 39–47.

Smolewski, P., Witkowska, M., Korycka-Wołowiec, A. (2013). New insights into biology, prognostic factors, and current therapeutic strategies in chronic lymphocytic leukemia. *ISRN Oncology*, 2013: 1–7.

Stephens, D.M., Byrd, J.C. (2012). Chronic lymphocytic leukemia with del (17p13.1): a distinct clinical subtype requiring novel treatment approaches. *Oncology*, 26: 1044–1054.

Strati, P., Jain, N., O'Brien, S. (2018). Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 93: 651–664.

Surget, S., Khoury, M.P., Bourdon, J.C. (2014). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets and Therapy*, 7: 57–68.

Šimkovič, M., Motyčková, M., Vodárek, P., Smolej, L. (2017). Léčba starších a komorbidních nemocných s chronickou lymfocytární leukemií. *Onkologie*, 11: 108–114.

Špaček, M. (2015). Malé molekuly v léčbě chronické lymfocytární leukemie v roce 2015 a v blízké budoucnosti. *Klinická Onkologie*, 28: 45–49.

Tari, K., Shamsi, Z., Reza-Ghafari, H., Atashi, A., Shahjahani, M., Abroun, S. (2018). The role of the genetic abnormalities, epigenetic and microRNA in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Experimental Oncology*, 40: 261–267.

Thompson, P.A., O'Brien, S.M., Xiao, L., Wang, X., Burger, J.A., Jain, N., Ferrajoli, A., Estrov, Z., Keating, M.J., Wierda, W.G. (2015). β 2-microglobulin normalization within 6 months of ibrutinib-based treatment is associated with superior progression-free survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 122: 565–573.

Tobón, G.J., Izquierdo, J.H., Cañas, C.A. (2013). Autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Diseases*, 2013: 1–17.

Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S., Scorilas, A. (2011). The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Advances in Hematology*, 2012: 1–15.

Váleková, L., Chudej, J., Sokol, J. (2014). Laboratórna diagnostika CLL: cytológia, prietoková cytometria. *Onkológia*, 9: 166–172.

Viñolas, N., Reverter, J.C., Urbano-Ispizua, A., Montserrat, E., Rozman, C. (1987). Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance. *Blood Cells*, 12: 457–70.

Vokurka, M., Hugo, J. (2006). Velký lékařský slovník. Praha: Maxdorf, ISBN: 978-80-7345-130-1.

Zhu, D.X., Xu, W., Li, J.Y. (2008). Gene atm and chronic lymphocytic leukemia. *Journal of experimental hematology*, 16: 1242–1246.

Zuchnická, J., Fečková-Mihályová, J., Hájek, R. (2016). Chronická lymfocytární leukemie, současné možnosti léčby. *Remedia*, 26: 446–453.

14 Seznam použitých zkratek

ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách

AT – *ataxia-telangiectasia*

ATM – tumor supresorový gen

ATP – adenosintrifosfát

B2M – beta-2-mikroglobulin

BAK – pro-apoptický gen

BAX – pro-apoptický gen

BCL2 – protoonkogen, který působí proti apoptóze

BCLW – anti-apoptický gen

BCL-XL – anti-apoptický gen

BCR – B-buněčný receptor

BTK – Brutonova tyrozin kináza

CD10 – povrchový antigen T buněk

CD19 – povrchový antigen B buněk, vč. maligních

CD2 – povrchový antigen T buněk

CD20 – povrchový antigen B buněk

CD23 – nízkofinální receptor pro IgE, FcRII

CD38 – glykoprotein na povrchu bílých krvinek

CD4 – povrchový antigen T_H buněk

CD5 – povrchový antigen T buněk

CD52 – povrchový antigen B buněk

CD79b – transmembránový protein tvořící komplex s BCR

CD8 – povrchový antigen T_c buněk

CDC – aktivace komplementu

CLB – chlorambucil

CLL – chronická lymfatická leukémie

CR – kompletní remise

CT – výpočetní tomografie

Cys 481 – cysteinový zbytek kinázy

DCD – indukce apoptózy

DLEU2 – tumor supresorový gen

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DSBs – dvouvláknové zlomy DNA
ECOC – Východní kooperativní onkologická skupina v USA
FCR – chemoterapeutický režim (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab)
FDR – fludarabin
FISH – fluorescenční in situ hybridizace
FMC7 – antigen
G1/S – první kontrolní bod buněčného cyklu
G2/M – druhý kontrolní bod buněčného cyklu
GA101 – obinutuzumab
HR – vysoké riziko
Ig – membránový imunoglobulin
IgG1 – třída imunoglobulinu G
IgH – těžký řetězec imunoglobulinu
IGVH – variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu
IR – střední riziko
IWCLL – International Workshop on CLL
LDT – zdvojovací čas lymfocytů
LR – nízké riziko
MDM2 – enzym pracující jako ubiquitin ligáza
MHCII – hlavní histokompatibilní complex II. třídy
MirRNA – mikroRNA
NK-buňky – „přirození zabíječi“
NOTCH1 – receptor
OS – celkové přežití
P21 – protein tlumící činnost cyklin-dependentních kináz
PFS – přežití bez progresu
PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza
Plt – trombocyty
PS – performance status
Rb1 – retinoblastomový protein
Slg – povrch imunoglobulinu
TK – thymidinová kináza
TP53 – tumor supresorový gen
ZAP70 – zeta asociovaný protein 70