

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Dizertační práce

Molekulární cytogenetika chronické
lymfocytární leukémie

duben 2020

Mgr. Lenka Krůzová

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Molekulární cytogenetika chronické
lymfocytární leukémie

Mgr. Lenka Krůzová

Dizertační práce

Olomouc, 2020

Doktorský studijní program: Lékařská genetika

Školitel: Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.

Palacky University Olomouc
Faculty Of Medicine and Dentistry



Molecular cytogenetics of chronic
lymphocytic leukemia

Mgr. Lenka Kruzova

Doctoral thesis

Olomouc, 2020

Doctoral Study Programme: Medical Genetics

Supervisor: Mgr. Helena Urbankova, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma “Molekulární cytogenetika chronické lymfocytární leukémie“ vypracovala samostatně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Lenka Krůzová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala Mgr. Heleně Urbánkové, Ph.D. za odborné rady, vedení, trpělivost a velmi příjemnou spolupráci. Dále také prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc. za vedení v začátcích mého studia. Poděkování patří i kolegyním RNDr. Mileně Holzerové, Ph.D., Mgr. Janě Balcárkové, Ph.D., Mgr. Michaele Vatošíkové, Mgr. Miroslavě Mlynářčikové, Mgr. Nele Kasalové, Jitce Kropáčkové, Ivě Prekopové a Janě Hanzlíkové za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. V neposlední řadě patří velké díky prof. MUDr. Tomáši Papajíkovi, CSc. za pomoc a cenné rady při zpracování dat k publikacím, Doc. Ing. Evě Kriegové, Ph.D. za molekulárně genetické analýzy mutací genu *TP53* a expresí genu na dlouhém rameni chromozomu 6, Doc. MUDr. Mgr. Marku Mrázovi, Ph.D. za analýzy relativní exprese genu *FOXO3* a také celému kolektivu Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc a Univerzity Palackého v Olomouci za spolupráci.

Na závěr bych také ráda poděkovala celé své rodině za psychickou podporu a dodání potřebných sil a odhodlání nejen v náročných obdobích mého studia.

Dizertační práce byla vypracována za finanční podpory grantů: VES16-32339A, FNOI 00098892, IGA MZ ČR NT 13576, IGA_LF_2014_001, IGA_LF_2015_001, IGA_LF_2016_001, IGA_LF_2017_007, IGA_LF_2018_004, IGA_LF_2019_001.

Souhrn

Chronická lymfocytární leukémie CLL je nejčastější hematologickou malignitou v západních zemích a je typická svou klinickou heterogenitou. Přístup k nemocným, volbu léčebné strategie a dobu přežití od diagnózy ovlivňují prognostické faktory. Kromě klinických znaků (např. zdvojovacího času lymfocytů a dalších zahrnutých ve stážovacích systémech podle Rai a Binet) se jedná o imunofenotypické markery (expresi CD38), mutační stav *IGHV*, pohlaví či věk pacientů a v neposlední řadě také chromozomové aberace. Ty v současné době detekujeme až u 82 % pacientů a jejich vyšetření je součástí diagnostických doporučení. Nejčastěji se setkáváme s delecemi oblasti 13q14, genů *ATM*, *TP53* a trizomií chromozomu 12, které jsou součástí tzv. CLL panelu vyšetřovaného metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Tato práce se věnuje jak teoretické charakterizaci rekurentních cytogenetických aberací v kontextu molekulárně cytogenetickém a molekulárně biologickém, tak konkrétním výsledkům analýz molekulárně cytogenetických vyšetření provedených v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Zaměřila jsem se na méně časté aberace a jejich dopad na průběh onemocnění.

Studovali jsme vliv komplexního karyotypu (3 a více cytogenetických aberací v jednom klonu) na celkové přežívání pacientů s CLL a souvislosti s delecemi dlouhého ramene chromozomu 11, krátkého ramene chromozomu 17 a mutacemi genu *TP53*. Dále jsme se zabývali delecemi na dlouhém rameni chromozomu 6, u kterých jsme určili minimální deletovanou oblast a vytypovali kandidátní gen *FOXO3* se sníženou relativní expresí. Také jsme provedli analýzu zmnožení krátkých ramen chromozomu 2, které se často vyskytují již v době diagnózy CLL a korelují s výskytem komplexního karyotypu. Potvrdili jsme, že všechny studované aberace mají negativní prognostický význam a celkové přežívání nemocných je s těmito změnami signifikantně kratší.

Výsledky této práce mohou přispět k pochopení patogeneze CLL a lepší stratifikaci pacientů na základě jejich cytogenetických aberací, což je v dnešní době cílené terapie nutností. I s ohledem na omezené možnosti kultivace patologických B-lymfocytů navrhuje zařazení dalších sond do klasického CLL panelu vyšetřovaného metodou interfázní FISH, popřípadě provádění metody arrayCGH (array komparativní genomová hybridizace), mapující nebalancované změny celého genomu.

Klíčová slova: chronická lymfocytární leukémie (CLL), molekulární cytogenetika, chromozomové aberace, komplexní karyotyp, delece 6q, zmnožení 2p

Summary

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common hematological malignancy in Western countries and is characterized by its clinical heterogeneity. Prognostic factors affect clinical outcome, overall survival as well as treatment strategy. In addition to clinical features, such as lymphocyte doubling time and others included in clinical staging systems of Rai and Binet, they are mainly represented by immunophenotypical markers (expression of CD38), mutational status of *IGHV*, sex or age of CLL patients, and last but not least by chromosome aberrations. Cytogenetic changes are detected in up to 82% of patients and their examination is part of the diagnostic recommendations. Deletions of 13q14, *ATM*, *TP53* genes and trisomy of chromosome 12 are the most frequent cytogenetics aberrations and they are part of the CLL panel examined by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

This thesis covers theoretical characterization of recurrent cytogenetic aberrations in the context of molecular cytogenetics and molecular biology as well as real results of cytogenetic analyses performed at the Laboratory of Cytogenetics and Molecular Cytogenetics at the Department of Hemato-oncology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University in Olomouc. I focused on less frequent aberrations and their impact on patient`s outcome.

We studied the effect of complex karyotype (3 or more cytogenetic aberrations in one clone) on the overall survival of CLL patients and its association with deletions of long arm of chromosome 11, short arm of chromosome 17 and mutations of *TP53* gene. Furthermore, we focused on deletions along of the long arm of chromosome 6, we determined the minimal deleted region and identified a candidate gene *FOXO3* with reduced relative expression. Last but not least, we performed an analysis of gains of the short arm of chromosome 2, which often occurred at the time of diagnosis of CLL and correlated with a complex karyotype. We confirmed that all studied aberrations had negative prognostic impact. The overall survival of patients with these changes is significantly shorter.

The results of these studies may contribute to better understanding of the CLL pathogenesis and better patient`s stratification based on their cytogenetic aberrations,

which is necessary in the era of targeted therapies. Considering the limited possibilities of cultivation of pathological B-lymphocytes, we suggest either the inclusion of additional probes into the classical CLL panel examined by the interphase FISH, or using the arrayCGH (array comparative genomic hybridisation) method for mapping the unbalanced aberrations of whole genome.

Key words: chronic lymphocytic leukemia (CLL), molecular cytogenetics, chromosomal aberrations, complex karyotype, deletion of 6q, gain of 2p

Obsah

Čestné prohlášení	4
Poděkování	5
Souhrn	6
Summary	7
1. ÚVOD	12
1.1 Normální vývoj B-lymfocytů	12
1.2 Chronická lymfocytární leukémie (CLL).....	13
1.2.1 Obecná charakteristika onemocnění.....	13
1.2.2 BCR signalizace	15
1.2.3 Role mikroprostředí.....	16
1.2.4 Klinické stážování	17
1.2.5 Cytogenetické a molekulárně-cytogenetické prognostické faktory	18
Delece <i>TP53</i>	18
Delece <i>ATM</i>	19
Delece 13q14.....	21
Trizomie chromozomu 12	23
Duplikace <i>MYC</i> (8q24).....	24
Delece 6q21	25
Přestavba <i>IGH</i>	26
Zmnožení krátkého ramene chromozomu 2.....	27
Komplexní karyotyp.....	28
1.2.6 Léčba	29
1.2.7 Richterova transformace (Richterův syndrom).....	35
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	37
3. SOUBOR PACIENTŮ A METODY	38
3.1 Pacienti	38
3.2 Metody	38

3.2.1 Kultivace biologického materiálu	38
3.2.2 Konvenční cytogenetika (G-pruhování).....	38
3.2.3 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	39
3.2.4 Array komparativní genomová hybridizace (arrayCGH).....	39
3.2.5 Statistické metody	39
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	41
4.1 Komplexní karyotyp (CK)	41
4.1.1 Soubor pacientů.....	41
4.1.2 Výsledky.....	42
4.1.3 Diskuze.....	60
4.2 Delece dlouhých ramen chromozomu 6.....	62
4.2.1 Soubor pacientů.....	62
4.2.2 Výsledky.....	63
4.2.3 Diskuze.....	67
4.3 Zmnožení dlouhých ramen chromozomu 2.....	69
4.3.1 Soubor pacientů.....	69
4.3.2 Výsledky.....	70
4.3.3 Diskuze.....	83
4.4 Komentáře k dalším publikacím	86
4.4.1 Improving risk-stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia using multivariate patient similarity networks	86
4.4.2 Biological and clinical characteristics of patients with chronic lymphocytic leukemia with the <i>IGHV3-21</i> and <i>IGHV1-69</i> ; analysis of data from a single center	88
5. ZÁVĚR.....	90
Seznam použitých zkratk.....	92
Literatura	96
Práce související s dizertační prací.....	108

Přílohy	113
Příloha č. 1	113
Příloha č. 2	114
Příloha č. 3	115
Příloha č. 4	116
Příloha č. 5	117
Příloha č. 6	118

1. ÚVOD

1.1 Normální vývoj B-lymfocytů

Krvetvorba je kontinuální regulovaný proces produkce krevních buněk, který zahrnuje obnovu, proliferaci, diferenciaci a zrání. Výsledkem těchto procesů je formace, vývoj a specializace všech funkčních krevních buněk, které jsou uvolňovány z kostní dřene do oběhu [1]. Všechny krevní buňky mají svého předka v hematopoetické kmenové buňce (HSC). Z té se liniově specifikují jednotlivé krevní řady, a ztrácejí tak schopnost sebeobnovy. Tato kmenová buňka se diferencuje na dva progenitory – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidního progenitoru vznikají erytrocyty, trombocyty, granulocyty a monocyty a z lymfoidního progenitoru se další diferenciací rozlišují B- a T-lymfocyty a NK-buňky. Každá z těchto buněk se vyznačuje specifickými povrchovými markery, což umožňuje jejich identifikaci a charakterizaci průtokovou cytometrií [2]. Diferenciace do jednotlivých vývojových řad se děje pod vlivem několika vnějších a vnitřních faktorů. Jedná se o působení růstových faktorů (hormonů a cytokinů) a transkripčních regulátorů, které iniciují nebo zvyšují expresi potřebných genů [3].

B-lymfocyty jsou buňky zajišťující humorální specifickou imunitu a jejich hlavní funkcí je produkce protilátek – imunoglobulinů. V embryonálním vývoji se B-lymfocyty vyvíjejí ve fetálních játrech a po narození se krvetvorba přesouvá do kostní dřene [4]. Z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky vzniká lymfoidní kmenová buňka, která se diferencuje na proB-lymfocyt. Důležitou roli ve vývoji B-lymfocytu má také B-buněčný receptor (BCR) na povrchu samotného B-lymfocytu, jehož součástí jsou právě imunoglobuliny. Jedná se o heterodimerní glykoproteiny tvořené těžkými (IgH) a lehkými řetězci (IgL), které pak mají stejnou specifitu jako BCR. Geny pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinů se skládají ze segmentů V (variable), D (diversity), J (joining) a C (constant), které se tvoří až během zrání v kostní dřeni náhodným přeskupováním (rearrangement) nebo rekombinací V, D a J u těžkých řetězců (fáze proB-lymfocytu) a V a J segmentů u lehkých řetězců (fáze preB-lymfocytu). Výsledkem těchto fází vývoje je naivní zralý B-lymfocyt, který se následně přesouvá do lymfatických uzlin, kde se dále diferencuje v paměťovou nebo plazmatickou buňku. Vývoj plazmatické buňky je závislý na průchodu B-lymfocytu germinálním centrem, kde dochází k enzymaticky indukovaným somatickým

hypermutacím variabilních oblastí těžkých řetězců imunoglobulinových genů díky působení AID (activation-induced cytidine deaminase), způsobující vyšší afinitu k antigenům [5]. Na základě toho, zda B-lymfocyt prošel germinálním centrem a došlo k somatickým hypermutacím, se určuje mutační stav *IGHV*, který je důležitým prognostickým markerem CLL (chronická lymfocytární leukémie).

1.2 Chronická lymfocytární leukémie (CLL)

1.2.1 Obecná charakteristika onemocnění

Chronická lymfocytární leukémie je nízce agresivní hematologické lymfoproliferativní onemocnění, představuje však nejčastější typ leukémie dospělého věku v západním světě, s incidencí v Evropě 6 nových případů u mužů a 4 u žen na 100 000 obyvatel a rok [6]. Jedná se o velice heterogenní onemocnění, kdy někteří pacienti přežívají dlouhá léta bez symptomů, jiní však umírají velmi rychle od stanovení diagnózy. Vyznačuje se proliferací klonálních, vyzrálých a maligně transformovaných B-lymfocytů, které se nekontrolovaně dělí a mají porušenou dráhu apoptózy. Dochází tedy k akumulaci těchto B-lymfocytů v krevním oběhu [7]. Medián věku při diagnóze je 70 let [8, 9] a postihuje častěji muže než ženy (v poměru téměř 2:1). Věk a pohlaví nemocného jsou jedněmi ze základních prognostických faktorů CLL [10, 11].

Ke stanovení diagnózy pacientů dochází na základě vyšetření krevního obrazu, kde díky akumulaci B-lymfocytů bývá typická lymfocytóza ($> 5 \times 10^9/l$). Tyto lymfocyty také mívají atypickou morfologii, většinou se jedná o malé zralé lymfocyty s úzkým lemlem cytoplazmy s kondenzovaným jádrem a bez jadérka [12]. Krevní obraz pacientů je pravidelně sledován, a pokud stoupne hladina lymfocytů v krvi na dvojnásobnou hodnotu (tzv. zdvojovací čas lymfocytů, LDT – lymphocyte doubling time) za dobu kratší jednoho roku, je tento faktor brán jako negativní [13]. Dalším negativním faktorem ovlivňujícím CLL jsou anémie a trombocytopenie. Dle Halleka je limitní anémie charakterizovaná hladinou hemoglobinu $< 100\text{--}110 \text{ g/l}$ a trombocytopenie množstvím trombocytů $< 100 \times 10^9/l$ [14]. I z hlediska klinických stážovacích systémů je zřejmé, že tito pacienti pak mají horší prognózu a celkové přežívání (viz Stážovací systémy, str. 16) [15, 16].

Ke stanovení diagnózy významným způsobem přispívá i průtoková cytometrie (flowcytometrie), která stanovuje expresi specifických antigenů na povrchu B-lymfocytů. Mezi znaky charakteristické pro CLL patří: pozitivní exprese CD5, CD20, případně CD23, nízká exprese sIg (povrchový imunoglobulin), absence znaku FMC-7 a negativní nebo nízká exprese CD22 [12]. Kromě těchto antigenů se touto metodou vyšetřuje i znak CD38, který je široce exprimován řadou krevních buněk [17]. Má funkci jak enzymu, tak receptoru. V normální zralé B-buňce je jeho exprese omezena na zárodečná centra sekundárních lymfoidních folikulů. Exprese znaku CD38 u pacientů s CLL koreluje s mutačním stavem *IGHV* [18, 19].

Na základě mutačního stavu *IGHV*, a tedy fáze B-buněčné diferenciace, kdy byly buňky transformovány, se CLL rozděluje na dvě podskupiny: s a bez VH somatických hypermutací, které mají různé klinické znaky. Pacienti s $\geq 98\%$ homologií s germinální sekvencí mají nemutovaný stav *IGHV*, u pacientů s $< 98\%$ homologií hovoříme o mutovaném stavu [18, 20]. Pacienti s nemutovanými geny *IGHV* mají vyšší pravděpodobnost výskytu CD38+ B-lymfocytů, špatně reagují na léčbu a mají kratší přežívání. Také bylo zjištěno, že mutovaný stav *IGHV* se vyskytuje rovnoměrně jak u žen, tak u mužů. Avšak nemutovaný stav *IGHV* a pozitivita znaku CD38 jasně převažuje u mužů [18]. Nicméně v práci Jain a kol. bylo prokázáno, že mutační stav nedělí pacienty pouze na dvě podskupiny, ale jedná se spíše o kontinuální proměnnou. V závislosti na procentuální homologii s germinální sekvencí byla kontinuálně ovlivňována doba do progresu i celkové přežívání nemocných [21].

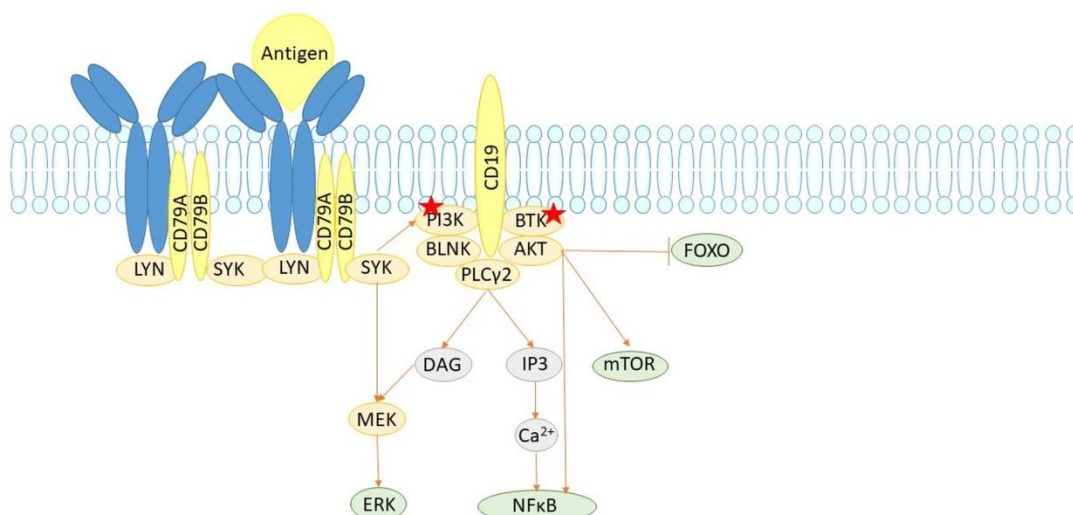
Až u 30 % pacientů bývá detekován tzv. stereotypní B-buněčný receptor. Tito pacienti sdílí vysoce homologní (stereotypní) sekvenci CDR3 (complementarity-determining region 3) imunoglobulinových genů [22]. Nejčastěji se jedná o subsety #1 (*IGHV1-5-7/IGHD6-19/IGHJ4*), #2 (*IGHV3-21/IGLV3-21*), #4 (*IGHV4-34/IGKV2-30*), #8 (*IGHV4-39/IGHD6-13/IGHJ5*) a #10 (*IGHV4-39* a *IGHV2-5/IGHD2-2/IGHJ6*) [23]. Případy s určitými subsety vykazují specifické biologické i klinické charakteristiky. Například pacienti se subsetem #4 jsou mladší s indolentním průběhem nemoci, pacienti exprimující *IGHV3-21* mají agresivní průběh nemoci, a to i bez ohledu na mutační status *IGHV* [22, 24]. U pacientů se subsetem #1 byla prokázána asociace s delecí 11q [25], delecí 17p, pozitivitou buněk na znaky ZAP-70 a CD38, kratší dobou do první léčby i celkovým přežíváním [23], a to i v porovnání s pacienty vykazující

stejně negativní prognostické znaky. Subset #2 byl silně asociován s delecí 13q, subsety #8 a #10 s trizomií chromozomu 12 [23, 25].

1.2.2 BCR signalizace

B-buněčný receptor (BCR, B-cell receptor) je transmembránový proteinový komplex, který je propojen s celou řadou kináz a fosfatáz, jejichž aktivací dochází k přenosu signálu. BCR je tvořen imunoglobuliny (IgA, IgD, IgE, IgG nebo IgM), které jsou nekovalentně vázány k CD79A a CD79B proteinům zajišťujících jejich kinázovou funkci. Po antigenem stimulované aktivaci dochází k agregaci BCR receptorů, změně jejich konformace a aktivaci kinázy LYN. Po vazbě LYN k heterodimeru CD79A/B dochází k fosforylaci ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) regulačních proteinů a změně jejich konformace, která umožňuje vazbu a následnou fosforylaci kinázy SYK (spleen tyrosine kinase) [26, 27]. SYK následně spouští aktivaci Brutonovy kinázy (BTK), AKT, fosfoinositol-3 kinázy (PI3K), fosfolipázy C γ 2 (PLC γ 2), BLNK (B-cell linker protein) a dalších. Ko-receptorem v celé signalizační kaskádě je transmembránový protein CD19, který je nezbytný k aktivaci PI3K. K té dochází po fosforylaci kinázou SYK. PI3K pak aktivuje PLC γ 2, BTK a AKT a částečně inhibuje GSK3A, B a FOXO1. Prostřednictvím diacylglycerolu (DAG), inositol-1,4,5-trifosfátu (IP3) a Ca²⁺ jsou pak aktivovány signalizační dráhy ERK (MEK-extracellular signal-regulated kinase) a NF κ B [27, 28]. Zjednodušené schéma BCR signalizace viz Obrázek 1.

BCR je zásadní komponentou pro přežití B-lymfocytu i jeho diferenciaci a zrání. U CLL dochází ke konstitutivní aktivaci BCR díky vazbě autoantigenu k povrchovému imunoglobulinu [29]. U pacientů s nemutovaným *IGHV* je BCR signalizace obvykle zesílená a buňky tak snadněji proliferují. U pacientů s mutovaným *IGHV* častěji dochází ke stavu tzv. anergie. Anergické buňky mají poškozenou dráhu BCR signalizace zřejmě díky konstitutivní fosforylaci SHIP1 (Src homology-2 (SH2)-containing inositol-5-phosphatase) a jeho adaptoru Dok-1 [30], což by mohlo vysvětlovat rozdílnou prognózu a přežívání u pacientů s mutovaným/nemutovaným stavem *IGHV*. Stav anergie není nevratný a je jednou z drah umlčování autoreaktivních B-lymfocytů. Dalšími mechanismy, které pomáhají bránit organismus proti autoimunitním reakcím je klonální delece a editace receptoru [31-34].



Obrázek 1: Zjednodušené schéma BCR signalizace

1.2.3 Role mikroprostředí

Kromě BCR signalizace jsou nádorové B-lymfocyty také závislé na mikroprostředí. V proliferačních centrech lymfatických uzlin přichází do kontaktu s nenádorovými buňkami – stromálními buňkami, T-lymfocyty, nurse-like buňkami a mezenchymálními stromálními buňkami. Ty uvolňují chemokiny, cytokiny, integriny a členy rodiny TNF (tumor necrosis factor) nutné k přežití CLL buněk, např. BAFF (B-cell activating factor) a APRIL (a proliferation-inducing ligand) aktivující kanonickou dráhu NFκB [28, 35].

CLL buňky po stimulaci BCR uvolňují chemokiny, např. CCL22, kterými mohou přitahovat podpůrné buňky jako T-lymfocyty [36]. Ty produkují cytokin IL4 (interleukin 4), který díky zvýšené regulaci povrchového IgM může usnadnit stimulaci BCR autoantigenem, zejména u pacientů s nemutovaným *IGHV* [37]. Kromě IL4 uvolňují T-buňky i TNFα, který také stimuluje růst CLL buněk a jejich přežívání. V proliferačních centrech významná část T-lymfocytů exprimuje CD40L (CD154, člen TNF rodiny), který se může vázat na CD40 pozitivní CLL buňky, a tím je chrání před apoptózou [38].

Chemokiny jsou molekuly usnadňující „uhníždění“ CLL buněk v mikroprostředí. Chemokin uvolňovaný stromálními buňkami SDF-1 (stromal cell-derived factor-1, nebo také CXCL12, CXC-chemokine ligand 12), který snižuje expresi receptoru CXCR4, aktivuje dráhu ERK a chrání leukemické buňky před apoptózou. Buňky, které

opustily lymfatickou uzlinu, mají všeobecně nízkou expresi CXCR4 (CXCR4^{dim}) a vysokou expresi CD5 (CD5^{bright}) [28, 39, 40]. Také bylo prokázáno, že buňky, které „čerstvě“ opustily lymfatickou uzlinu a její mikroprostředí, mají i vyšší expresi CD20 [41].

Další významnou signální dráhou ovlivňovanou mikroprostředím je WNT kanonická i nekanonická signální dráha. Ligand Wnt5a se váže na ROR1 receptor (Receptor tyrosin kinase-like orphan receptor 1), aktivuje RhoA a RAC1/2, čímž zesiluje chemotaxi, buněčnou migraci a proliferaci [42-45].

1.2.4 Klinické stážování

V současné době se používají dva hlavní způsoby klinického stážování CLL. První podle Raie a kol. (1975) a druhý dle Bineta a kol. (1981) [15, 16].

1. Rai a kol. [15] navrhli klasifikaci založenou na předpokladu, že CLL je onemocněním progresivní akumulace nefunkčních lymfocytů. Rozlišují 5 stádií:

Stádium	Příznaky
I	pouze lymfocytóza v krvi a kostní dřeni
II	lymfocytóza s lymfadenopatií
III	lymfocytóza se splenomegalií a/nebo hepatomegalií
IV	lymfocytóza s anémií (Hb méně než 110 g/l)
V	lymfocytóza s trombocytopenií (trombocytů méně než $100 \times 10^9/l$)

2. Binet a kol. [16] navrhli klasifikaci sestávající ze tří stádií:

Stádium	Příznaky
A	Méně než tři postižená místa*, bez anémie a trombocytopenie
B	Tři nebo více postižených míst*, bez anémie a trombocytopenie
C	anémie (Hb méně než 100 g/l) a/nebo trombocytopenie (počet trombocytů méně než $100 \times 10^9/l$)

**Postižená místa – počítá se jako jeden každý z těchto: axilární, krční, inguinální, mízní uzliny, ať jednostranné nebo oboustranné, slezina a játra*

1.2.5 Cytogenetické a molekulárně-cytogenetické prognostické faktory

CLL je onemocnění s velmi heterogenním průběhem, u některých nemocných je mírný, zatímco u jiných se chová velmi agresivně. Snahy o stanovení prognózy u jednotlivých pacientů se opírají o klasické rizikové faktory, jakými jsou: klinické stádium, zdvojovací čas lymfocytů, morfologie nádorových B-lymfocytů, věk, pohlaví a fyzický stav pacienta v době diagnózy apod. V posledních letech však došlo k velkému pokroku v oblasti cytogenetické a molekulárně-cytogenetické diagnostiky CLL, kdy byly definovány nové spolehlivé molekulární markery tohoto onemocnění (mutace, chromozomové aberace).

Již od 70. let minulého století bylo u CLL pacientů různými cytogenetickými a molekulárně cytogenetickými technikami detekováno široké spektrum chromozomových změn. Nejčastěji se jednalo o parciální delece chromozomů 13, 11 a 17, méně často o zisk celých chromozomů, např. chromozomu 12 [46, 47]. Nicméně vzhledem k nízké mitotické aktivitě nádorových CLL buněk byla v dřívějších dobách detekce cytogenetických změn značně omezená a komplikovaná. Ke zvýšení záchyty chromozomových aberací metodou klasické cytogenetiky vedla kultivace CLL buněk s CpG oligonukleotidy a interleukinem 2 (IL2) zavedená do rutinní praxe v poslední dekádě 20. století, která se ukázala být spolehlivou a užitečnou metodou v určování cytogenetických změn [48]. Díky fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) se záchyt vybraných genomových aberací u pacientů s CLL ještě zvýšil a tato metoda umožnila detekci chromozomových aberací až u 82 % CLL pacientů. Nejčastěji detekovanými změnami jsou delece 13q (55 %), delece 11q (18 %), trizomie 12 (16 %), delece 17p (7 %) a delece 6q (6 %), které se zásadně liší mediánem přežití pacientů [10].

Delece TP53

Delece nebo mutace genu *TP53* je považována za nejdůležitější prognostický i prediktivní faktor u CLL. Protein p53 je kódován genem *TP53*, který leží na krátkých ramenech chromozomu 17 (17p13). Jedná se o nejvýznamnější tumor supresorový gen též nazývaný strážce genomu. Má významnou roli při opravách DNA a obraně buněk proti genotoxickému/onkogennímu stresu, hypoxii a dalším kritickým změnám. Funguje také jako transkripční faktor, který spouští transkripci genů zapojených do mnoha buněčných procesů. Při stresu je stabilizován kinázou *ATM*, zastavuje buněčný cyklus a spouští opravy DNA, popř. apoptózu [49].

Delece *TP53* je asociována s velmi špatnou prognózou a rezistencí na chemoimunoterapii. Pacienti s delecí *TP53* mají nejkratší medián přežití a jsou u nich většinou detekovány další negativní prognostické markery – nemutovaný *IGHV* status, pozitivní exprese CD38 [50]. V mnohorozměrné analýze autoři Mayr a kolektiv (2006) potvrdili, že komplexní změny karyotypu, delece/translokace 17p, exprese CD38 jsou prognostickými faktory s nejvyšším nepříznivým dopadem na klinické výsledky [51]. Diskutuje se význam delecí/mutací v případě mutovaného *IGHV* [52], nicméně k této situaci nedochází velmi často a je třeba dalších studií.

Frekvence výskytu delecí/mutací *TP53* se liší v závislosti na stádiu onemocnění. V době diagnózy CLL se vyskytuje jen u 5–7 % nemocných. Delece 17p je až u 90 % pacientů doprovázena mutací druhé alely genu *TP53* [53, 54]. Samostatná mutace genu *TP53* bez delece 17p se v době diagnózy vyskytuje pouze u 1 % případů [55]. V době zahájení léčby frekvence abnormalit narůstá na 15–20 % případů a u refrakterních/relabovaných (R/R) pacientů tuto aberaci nacházíme až u poloviny z nich [10, 56]. Stává se tak jednou z nejčastějších aberací získaných v době léčby.

Dicker a kol. zjistili, že mutace *TP53* jsou signifikantně spojeny s delecí 17p a komplexními cytogenetickými abnormalitami. Pacienti s abnormalitami *TP53* mají významně kratší čas do léčby ve srovnání s pacienty bez aberací *TP53* [54]. U pacientů s delecí jedné alely *TP53* se často vyskytuje i mutace zbývající alely [57]. Kromě klasické cytogenetiky a FISH ke zjištění delecí na 17p by tedy měla být rutinně vyšetřována i mutace genu *TP53*. V recentních studiích se hodnotí význam procentuálního zastoupení daných delecí nebo mutací. Existují práce, dle kterých je významné i malé procento [58-60], nicméně i práce prokazující, že pacienti s delecemi/mutacemi do 20 % mají delší dobu do první léčby i celkové přežívání [61, 62]. O této problematice se také intenzivně diskutuje v rámci skupiny ERIC (European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia) [63].

Delece ATM

Gen *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) se nachází na chromozomu 11 v pruhu q22.3, skládá se z 66 exonů a má 146 kbp. Gen kóduje 370kD jaderný fosfoprotein homologní s fosfatidylinositol-3-kinázou (PI3K). PI3K příbuzné bílkoviny hrají roli v DNA opravách, DNA rekombinaci a kontrole buněčného cyklu. Gen je zodpovědný za autozomálně recesivní onemocnění ataxia telangiectasia (A-T). A-T je charakterizováno

jako onemocnění způsobující neurologickou degeneraci, imunodeficit, neplodnost, radiační citlivost a výraznou náchylnost k nádorovým onemocněním [64, 65]. Nejčastěji se jedná o nádory lymfatické soustavy, včetně nádorů B- a T-buněk [66]. Pacienti s delecí *ATM* mají přibližně 70krát vyšší riziko vzniku leukémie než běžná populace. Bialelické mutace genu *ATM* byly zjištěny také u pacientů s T-prolymfocytární leukémií [67]. Dochází jak k delecím jedné alely genu *ATM* a mutacím druhé alely (vede k aberantnímu přepisu, sestřihu a tedy změně nebo zkrácení proteinu), tak k mutacím obou alel genu [68]. Delece *ATM* způsobuje u pacientů rozsáhlá postižení lymfatických uzlin a je spojena se špatným přežíváním pacientů. Kromě vysoké náchylnosti k rozvoji leukémie a lymfomu mají pacienti s delecí *ATM* predispozici ke tvorbě dvojitých zlomů DNA (DSBs – double strand breaks) – *ATM* je součástí biochemických drah spojujících opravy DSBs, regulaci buněčného cyklu a programovanou buněčnou smrt. Některé z biologických funkcí *ATM* jsou regulovány prostřednictvím p53 fosforylace a aktivace dráhy p53. Mutované nebo deletované *ATM* tedy způsobuje aberace v p53 dráze [69].

Inaktivace genu *ATM* představuje molekulární událost, která vede ke vzniku samostatné podskupiny CLL. *ATM* mutace jsou omezeny na CLL s pregerminální charakteristikou buněk. Zde pak k inaktivaci *ATM* dochází nezávisle na změnách *TP53* genu a funkční ztráta *ATM* určuje odlišné buněčné odpovědi na poškození DNA. Nestává se často, že by pacienti nesli aberace genů *ATM* a *TP53* zároveň, avšak delece na 17p nebo 11q předurčují agresivní formu CLL. Delece 11q jsou celkem časté a většinou spojené s mutací zbývající alely, což má za následek ztrátu p53-dependentní apoptotické odpovědi na léčbu činidly poškozujícími DNA [53, 70].

Delece 11q, resp. genu *ATM* je stále považovaná za jeden z významných negativních prognostických faktorů pro pacienty s CLL, kteří mají výrazně kratší dobu do první léčby i celkové přežívání [10, 61, 71]. Dle Marasca a kol. však také záleží na procentuálním zastoupení delece 11q [72]. Ve své práci prokázali, že pacienti s méně než 25 % buněk s delecí 11q mají delší dobu do první léčby a také lépe na případnou léčbu odpovídají. Podle Jain a kol. ovlivňuje vyšší procento delecí 11q (nad 58 %) i celkové přežívání [71]. Nicméně Van Dyke a kol. ani jednu z těchto skutečností ve své studii nepotvrdili [61]. Kipps a kol. s ohledem na výsledky ze tří randomizovaných studií prokázali, že při léčbě ibrutinibem již delece 11q nemá negativní prognostický dopad [73].

Součástí delece 11q také často bývá také gen *BIRC3* (baculoviral IAP repeat-containing 3), který kóduje negativní regulátor NF-κB proteinu. Až 83 % pacientů s delecí 11q má kromě genu *ATM* deletovaný i gen *BIRC3* ležící v pruhu 11q22.2 [74]. Celkem 40 % pacientů s deletovaným genem *BIRC3* má zároveň mutaci i delecí *ATM*. K mutacím genu *BIRC3* může také docházet, ty jsou ale v době diagnózy vzácné. Vyskytují se u pacientů s delecí *BIRC3* a funkční reziduální alelou *ATM* [74] a u pacientů fludarabin-refrakterních s absencí *TP53* delece/mutace [75]. Podle Rose-Zerilli a kol. však delece/mutace *BIRC3* nemají vliv na celkové přežívání ani na dobu do progresu, tyto parametry spíše ovlivňuje u 11q deletovaných pacientů gen *ATM* [74].

Delece 13q14

Delece 13q14 je nejčastější cytogenetickou změnou u pacientů s CLL, vyskytuje se u 55 % nemocných a jako solo aberace je spojována s dobrou prognózou [10]. Klinický dopad dalších variant delece na 13q je stále kontroverzní a studie se tak zaměřují na význam velikosti delece 13q, procentuálního zastoupení delece 13q a význam bialelické delece [76-78].

V rámci minimální deletované oblasti (minimal deleted region – MDR) je deletován gen *DLEU2* (deleted in leukemia-2), jehož funkce je díky nekódující RNA stále neznámá. Nicméně obsahuje intronně uložené miR-15a a miR-16-1, které mají vliv na regulaci genu *BCL2* a podílejí se tak na patogenezi CLL [79-81]. MiRNA patří do třídy nekódujících RNA s funkcí regulace genové exprese na úrovni transkripce nebo translace. V závislosti na regulovaných genech mohou působit jako tumor supresory i jako onkogeny [82].

BCL2 (B-Cell Lymphoma 2) je antiapoptotický gen, jehož exprese bývá zvýšena u řady onkologických onemocnění (leukémie, lymfomy, karcinomy) [83]. MiR-15a i miR-16-1 jsou částečně homologní s mRNA *BCL2* genu a díky degradaci nebo ovlivnění stability této mRNA snižují jeho expresi. V buňkách s delecí je tak exprese genu *BCL2* zvýšena [84]. Dle Degheidy a kol. lze dokonce na základě exprese *Bcl2* určené flowcytometricky rozlišit pacienty s monoalelickou a bialelickou delecí 13q [85]. Počty kopií 13q pak pozitivně korelují s hladinami miR-15a a miR-16-1 [86]. MiR-15a a miR-16-1 tedy regulují buněčný cyklus a díky schopnosti indukce apoptózy a inhibice proliferace mají tumor supresorovou aktivitu [84].

Byla také prokázána snížená exprese miR-143 a naopak zvýšená exprese miR-155 u pacientů s delecí 13q nad 80 %, což kromě genů dráhy apoptózy (*BCL2*, *MDM2*, *TP53INP1*) ovlivňuje také dráhu proliferace (*KRAS*, PI3K-AKT signaling) [87]. U těchto pacientů byly také deregulovány miR-29a a miR-223 [88]. Dal Bo a kol. uvádí, že pacienti s delecí 13q14 v < 70 % buněk nezahrnující gen *RBI* mají delší dobu do léčby onemocnění než pacienti s delecí 13q14 ve ≥ 70 % [89]. I když se hladiny procent patologických buněk ovlivňující prognózu pacientů mezi jednotlivými pracemi liší (65–90 %), což může být také způsobeno rozdílnými způsoby kultivace patologických buněk [90], vyšší procenta v multivariantních analýzách ovlivňují biologickou charakteristiku a dobu do první léčby pacientů [78, 89, 91, 92].

Delece může také zahrnovat gen *RBI* (Retinoblastoma-1), který je už součástí tzv. velké delece, která je asociována s kratším přežíváním a může být znakem genomické nestability vedoucí ke komplexním přestavbám karyotypu [77, 93]. *RBI* gen je tumor-supresorový gen související s hereditárním nádorovým onemocněním – retinoblastomem. Kromě role v rámci nádorového vývoje má významnou funkci i v normálním vývoji buňky, kde reguluje specifické proteinové komplexy v reakci na různé signální dráhy. Tyto proteinové komplexy se účastní řady molekulárních procesů souvisejících s DNA, včetně genové transkripce, replikace DNA, opravy DNA a dělení buňky [94]. Prostřednictvím regulace těchto procesů hraje *RBI* jedinečně významnou roli jak v normálním buněčném vývoji, tak v nádorovém onemocnění. Lia a kol. zjistili, že ke zvýšené proliferaci dochází signifikantně dříve u delecí 13q14 o velikosti CDR (common deleted region – často deletovaná oblast telomericky k MDR, celkem o velikosti 0,80 Mb) v porovnání s delecemi 13q14 o velikosti MDR (minimal deleted region – nejmenší deletovaná oblast zahrnující klastr *DLEU2*/miR-15a/miR-16-1 o velikosti 0,11 Mb) [95]. Existují však práce, ve kterých se vliv větší delece 13q neprokázal [96], podle Yi a kol. ovlivňuje velikost delece 13q spíše jiná B-buněčná chronická lymfoproliferativní onemocnění, ne přímo CLL [97].

Kromě varianty monoalelické delece se u pacientů s CLL vyskytuje také bialelická delece 13q14, popř. obě varianty zároveň [98]. Bialelická delece bývá menšího rozsahu a většinou nezahrnuje gen *RBI* [76]. Byl prokázán signifikantní rozdíl v expresi obou miRNA u pacientů s bialelickou delecí 13q14 v 77 % buněk a více [99]. Dle Garg a kol. byly rozdíly mezi monoalelickou a bialelickou delecí 13q14 pouze v hladinách albuminu a expresi ZAP-70 [100]. Puiggros a kol. popsali, že vyšší incidenci výskytu

bialelické delece 13q mají pacienti s translokací t(13q), u kterých také častěji dochází k delecím *TP53* [101]. Klinicky významný rozdíl mezi monoalelickou a bialelickou delecí však neprokázali, i když připustili, že bialelická delece u klonálního vývoje může být sekundární událostí [78].

Trizomie chromozomu 12

U pacientů s CLL se jako jedna z nejčastějších numerických změn vyskytuje právě trizomie chromozomu 12 (+12). Tato změna byla zjištěna jako první genetická změna u CLL vůbec. I přesto není znám přesný prognostický význam. Většina pacientů nesoucích tuto aberaci je však zařazena do středních či vyšších klinických stádií. Trizomie 12 byla pozorována jak u typické, tak u atypické formy CLL [102]. Dle „klasické“ Döhnerovy klasifikace jsou pacienti s +12 zařazeni do středního prognostického rizika, tzn. s průběhem onemocnění horším než pacienti se solo delecí 13q nebo normálním karyotypem, ale lepším než pacienti s delecí 11q nebo 17p [10]. Ke stejným závěrům došla skupina autorů Van Dyke a kol., nicméně doba do první léčby byla u pacientů s +12 srovnatelná s pacienty s delecí 17p. Nutno však dodat, že OS (overall survival – celkové přežívání) je výrazně kratší u pacientů s delecí 17p [61]. Jedním z kandidátních genů lokalizovaných na chromozomu 12 je onkogen *MDM2* (12q13-14), dalšími například *KRAS-2*, *INT-1*, *CCND2*, avšak ani zde nebyla potvrzena asociace s CLL. Mdm2 je v autoregulační zpětné vazbě s nádorovým supresorem p53. Z tohoto důvodu by mohla hrát intracelulární hladina těchto dvou proteinů důležitou roli v buněčné proliferaci a nádorech. Nicméně statisticky významná korelace mezi expresí Mdm2 proteinu a klinickou etapou onemocnění se nepotvrdila [103]. V některých případech se s trizomií 12 zároveň objevuje trizomie 19 [47]. Dle studie Ibbotson a kol. se trizomie 12 a 19 vyskytuje v 2,1 % ze všech pacientů s trizomií 12 [104].

Také byla prokázána asociace +12 s mutacemi genu *NOTCH1*, což souvisí s pozitivní regulací buněčného cyklu, proliferací a současně horší prognózou [105]. *NOTCH1* kóduje transmembránový protein, který má roli ligandem-aktivovaného transkripčního faktoru. K mutacím dochází v PEST doméně, ta je součástí intracelulární domény, která je také cílem pro ubiquitinylation a degradaci [106]. Dle Balatti a kol. (2013) je *NOTCH1* mutace zodpovědná za progresi CLL vedoucí k agresivnější formě onemocnění s horším přežíváním [107] a zhoršuje tak intermediální prognózu pacientů s +12 [105].

Podle autorů Mittal a kol. mají pacienti s delecí 11q nebo +12 overexpresi genu *ATF5* a naopak sníženou expresi genů *CDC16*, *PCDH8*, *SLAM*, *MNDA* a *ATF2* [108]. Gen *ATF5* je člen rodiny aktivačních transkripčních faktorů, který reguluje diferenciaci a inhibuje apoptózu [109, 110]. Hraje tedy důležitou roli v buněčném cyklu a jeho ovlivněná exprese může hrát důležitou roli v kancerogenezi [110]. Mezi downregulované geny patří také další tumorsupresorové nebo proapoptotické geny: *cFOS*, *FOSB*, *FOSL2*, *CDKN1A* (p53 dependentní inhibitor buněčného cyklu) a *NR4A3* [107].

Zucchetto a kol. ve své studii prokázali, že pacienti s +12 téměř univerzálně exprimují znak CD49d, který je považován za negativní prognostický faktor, a jsou charakterizováni nejvyššími hladinami exprese tohoto znaku ze všech CD49d+ CLL [111]. Vysoká exprese CD49d také asociuje s *NOTCH1* mutacemi. Díky NOTCH1-dependentní aktivaci NFκB dochází k pozitivní CD49d regulaci exprese [112]. Dle Athanasiadou byla u pacientů s +12 prokázána také signifikantní pozitivita FMC-7 [113]. Buňky CLL s +12 mají zvýšenou expresi integrinů CD11b, CD18, CD29 a ITGB7 a adhezní molekuly CD323. Naopak sníženou expresi znaků CD11a, CD11b a CD18 mají pacienti CLL s +12 se současnou mutací genu *NOTCH1* [114]. Strati a kol. prokázali, že pacienti s +12 mají kromě očekávané zvýšené míry positivity CD38 a atypického imunofenotypu vyšší incidenci trombocytopenií, Richterovy transformace a sekundárních maligních neoplázií [115].

Duplikace MYC (8q24)

Gen *MYC* (8q24) je onkogenní transkripční faktor, který reguluje 10–15 % genů v genomu a kontroluje mnoho aspektů buněčného cyklu (DNA replikace, syntéza proteinů, regulace metabolismu, dělení buněk) [116]. V případě přestavby genu *MYC* dochází díky translokaci ke konstitutivně zvýšené expresi, většinou v důsledku vlivu například imunoglobulinových enhancerů. Přestavba genu *MYC* s *IGH* v translokaci t(8;14)(q24;q32) je primární změnou u Burkittova lymfomu a může se taktéž vyskytovat u DLBCL (difuzní velkobuněčný B-lymfom), kde současně s přestavbou genu *BCL2* odlišuje podskupinu double-hit lymfomů (popř. triple-hit lymfomů se současnou přestavbou genu *BCL6*) s velmi nepříznivou prognózou [117].

U nemocných s CLL se nejčastěji vyskytuje varianta duplikace *MYC*. Bylo zjištěno, že indukce *MYC* je závislá na MEK/ERK signální dráze. Je tedy pravděpodobné, že hraje

důležitou roli v antigenem indukované proliferaci buněk u pacientů s CLL [118]. Přestavba genu *MYC* se vyskytuje zřídka a byla pozorována převážně u pacientů pokročilého věku a mužského pohlaví. Přestavba *MYC* souvisí se zvýšenými počty prolymfocytů a nepříznivou prognózou [119] a může znamenat progresi onemocnění nebo transformaci CLL do Richterova syndromu [120]. *MYC* translokace byly často pozorovány zároveň s nepříznivými cytogenetickými markery jako je například delece 11q, 17p nebo monozomie 17 [121, 122]. Podle autorů Chapiro a kol. je vliv delece 17p a zmnžení 8q na přežívání synergický a jedná se o tzv. double hit CLL [123]. Abnormality chromozomu 8 (duplikace/přestavba 8q, popř. delece 8p) současně s delecí/mutací *TP53* bývají často součástí komplexního karyotypu, což vede k výrazně horšímu přežívání [122]. Kromě aberací genu *TP53* a stereotypního B-buněčného receptoru jsou abnormality genu *MYC* dalším rizikovým faktorem pro transformaci CLL do DLBCL [124].

Delece 6q21

Delece postihující dlouhé rameno chromozomu 6 (6q) patří mezi nejčastěji pozorované chromozomové aberace lymfoidních malignit a byly identifikovány jako negativní prognostický faktor. Co se týká CLL, delece v oblasti 6q21 se vyskytuje u 7–10 % pacientů [125, 126]. Není známo, které konkrétní geny na 6q jsou zodpovědné za lymfoproliferaci, ale jedním z kandidátních genů je *FOXO3* [127], který má zásadní význam ve spontánním i chemokin-indukovaném přežívání buněk CLL. To podporuje myšlenku, že homeostatické chemokiny přispívají k rezistenci CLL buněk k buněčné smrti díky inaktivaci transkripčního faktoru *FOXO3*, který může představovat nový terapeutický cíl [128]. Jarošová a kol. identifikovali MDR v pruhu 6q21, kde se nachází geny *SCML1*, *SEC63*, *OSTM1*, *NR2E1*, *SNX3*, *LACE1* a *FOXO3*. Byla prokázána nižší mRNA exprese genů *FOXO3*, *LACE1*, *SNX3* a *SCML4* u pacientů s delecí 6q [126]. *FOXO3* je kandidátní tumor-supresorový gen patřící do rodiny FOXO transkripčních faktorů (forkhead box O). Přežívání buněk (ať už normálních nebo maligních) je závislé na signální dráze PI3K-Akt-FOXO, navíc *FOXO3* má stejné vazebné místo jako FOXP1 (antiapoptotický transkripční faktor) [129]. FOXP1 funguje jako pozitivní regulátor BCR-signalizace, jehož vyšší exprese je asociována s horším přežíváním. Černá a kol. identifikovali miR-34a, která je indukovaná v odpovědi na DNA poškození a reprimuje FOXP1 (díky vazbě na 3'UTR vazebné místo) [130]. Musilová a kol. dále

identifikovali miR-150, jejíž vyšší exprese snižuje expresi genů kódujících proteiny zesilující BCR signalizaci. Buňky s nízkou hladinou miR-150 mají vyšší expresi *FOXP1* a *GAB1* (geny s 3'UTR konzervovaným vazebným místem pro miR-150) [131]. Delece 6q21 se jako primární změna u pacientů s CLL téměř nevyskytuje. Je to charakteristická sekundární změna spojená s progresí onemocnění. Pacienti s touto abnormalitou mají významně snížený interval přežití ve srovnání s ostatními pacienty [132]. Analýzy klinických charakteristik a laboratorních parametrů ukázaly, že pacienti s delecí 6q měli vyšší počet bílých krvinek a rozsáhlejší lymfadenopatii [125] a nález této delece je spojen i s dalšími negativními změnami: atypickou morfologií lymfocytů, častou splenomegalií, CD38+ a krátkým přežíváním [133].

Přestavba IGH

Gen pro těžký řetězec imunoglobulinů je další oblastí, která se zapojuje do chromozomových přestaveb u pacientů s CLL. Nachází se na chromozomu 14 v pruhu 14q32.33. Translokace tohoto genu není u pacientů s CLL tak častá, je však rekurentní (~7%) [10, 134-136]. Dle Cavazzini a kol. se přestavba *IGH* může vyskytnout v rámci klonální evoluce [137]. Obecně má přestavba *IGH* negativní prognózu díky translokaci do blízkosti onkogenu, čímž spouští jeho transkripci [138]. Kromě přestaveb *IGH* se u CLL mohou také vyskytnout přestavby *IGK* nebo *IGL*. Nejčastějšími translokačními partnery bývají *BCL2* (18q21), *BCL3* (19q13), *CCND1* (11q13), *MYC* (8q24). CLL s přestavbami IG lokusů jsou spojeny s atypickou morfologií buněk a geny vstupující do translokací s těmito lokusy se uplatňují v kontrole buněčného cyklu nebo apoptózy [139].

Autoři Cavazzini a kol. prokázali kratší dobu do léčby, pokročilejší stádium onemocnění, pozitivitu buněk na CD38 znak a horším přežíváním. Přežívání bylo srovnatelné se skupinou pacientů s komplexními karyotypy, i když z hodnocení byli vyloučeni pacienti s translokací t(11;14)(q13;q32) a také t(14;19)(q32;q13.2), kteří mají často atypickou formu CLL s rysy leukemizovaného B-NHL [136].

Jednou z nejčastějších přestaveb je translokace t(14;18)(q32;q21) s přestavbou genů *IGH/BCL2* [136]. *BCL2* je antiapoptotický gen, jehož translokací s *IGH* dochází k jeho konstitutivní expresi. Tato translokace je často asociována s folikulárním lymfomem a koreluje s výskytem trizomie chromozomu 12 [140, 141].

Translokace t(14;19)(q32;q13.2) s přestavbou *IGH/BCL3* asociuje s pozitivitou znaku CD38, nemutovaným *IGHV* a taktéž negativní prognózou [142-145]. Velmi často bývá doprovázena dalšími cytogenetickými aberacemi, např. trizomií 12 nebo komplexními karyotypy [144, 146]. Translokace genu *BCL3* vždy ústí v overexpresi bcl3 proteinu [147, 148], takže dochází k ovlivnění exprese NF-κB-dependenčních genů.

Přestavba genu *BCL2* ve srovnání s přestavbou *BCL3* není tak agresivní. Pacienti s přestavbou t(14;18) mají nižší lymfocytózu, méně často splenomegalii a také méně často exprimují CD38. Častěji se přestavba genu *BCL2* vyskytuje jako solo aberace, popř. zároveň s delecí oblasti 13q14 a mutovaným *IGHV* [149]. Pacienti s *IGH/BCL3* přestavbou mívají vysoké nebo velmi vysoké CLL-IPI skóre, mají kratší TTFT (time to first treatment, doba do první léčby) i OS (overall survival, celkové přežívání) [150].

Translokace t(2;14)(p16;q32) zahrnuje geny *IGH* a *BCL11A*. Jedná se o vzácnou přestavbu, která asociuje s atypickými morfologickými znaky, pozitivitou na ZAP-70 a nemutovaným *IGHV* [151]. *BCL11A* (dříve *EVI9*) je myeloidní nebo B-buněčný protoonkogen. Účastní se postnatálního vývoje a normální lymfopoézy a může fungovat i jako tumor-supresorový gen u T-buněčných malignit [152]. K lymfoidním malignitám může vést díky translokaci nebo také amplifikaci *BCL11A* [153].

Translokace t(11;14)(q13;q32) je velmi častou aberací u lymfomu pláštěvé zóny, popř u mnohočetného myelomu. U CLL je velmi vzácná [154]. Dochází k fúzi genů *CCND1* a *IGH*. CLL pacienti s přestavbou t(11;14) mají atypický imunofenotyp s CD19-, CD5+, CD23-/low, CD79b/sIgM(D)++, and FMC7+ a jsou charakterizováni špatnou prognózou [155].

Dále se spíše sporadicky vyskytuje translokace s geny *CCND3* (6p21) a *CDK6* (7q21) [136]. Kromě translokací genu *IGH* se setkáváme i s jinými variantami – např. s delecí 3'konce *IGH*, což má negativní prognostický dopad [138], nebo s delecí 5'konce *IGH* genu, která souvisí s fyziologickými procesy při přestavbách a rekombinacích V, D, J segmentů [156], vyskytuje se dokonce až u 82 % pacientů [157] a nemá vliv na prognózu pacientů.

Zmnožení krátkého ramene chromozomu 2

Zmnožení krátkého ramene chromozomu 2 (2p+) není častou změnou vyskytující se u pacientů s CLL, avšak jedná se o aberaci zhoršující pacientovu prognózu. Vyskytuje se u 2 až 8 % nemocných [158, 159] a v rámci minimálního rozsahu zmnožení (2p13–

2p25, 64 Mbp) jsou lokalizovány 3 známé onkogeny: *REL* (2p16), *ALK* (2p23) a *MYCN* (2p24). Gen *REL* kóduje transkripční faktor NF-κB rodiny a jeho zmnožení je časté u řady B-lymfomů [160]. *NMYC* kóduje transkripční faktor MYC rodiny a reguluje cyklus proliferace cerebrálních buněk, často bývá zmnožen u neuroblastomů [161]. Samostatně se tato změna vyskytuje vzácně, provází další chromozomové změny – delecí 13q, 11q, 18p, 17p a 6q. Zmnožení 2p se může vyskytovat v mnoha formách jako různé derivované chromozomy, popř. částečné trizomie. Duplicitní 2p sekvence bývá také zapojena do nebalancovaných translokací s dalšími chromozomy. Zmnožení 2p je tedy součástí dalších, často komplexních chromozomových změn, souvisejících s progresí onemocnění [158, 159]. Častá je současná přítomnost mutace genu *SF3B1* a zahrnutí zmnoženého krátkého ramene chromozomu 2 do komplexního karyotypu. Gen *NMYC* bývá zmnožen u pacientů s transformací do Richterova syndromu [162]. Celkově je zmnožení 2p mnohem častější u nemocných s nálezem nepříznivých cytogenetických delecí (*ATM*, *TP53*), nemutovaným stavem *IGHV*, expresí znaků CD38 a ZAP-70. Exprese ZAP-70 koreluje se zmnožením *ACPI* (2p25.3). Také byla prokázána zvýšená exprese genů *NCOA1* a *ROCK2* lokalizovaných na 2p, které hrají rozhodující roli v progresi CLL [163, 164].

Komplexní karyotyp

U 10–20 % nově diagnostikovaných pacientů se vyskytuje komplexní karyotyp [46, 48, 135, 165, 166]. Je charakterizován jako přítomnost 3 a více klonálních chromozomových aberací v karyotypu a je považován za silný nezávislý prognostický marker rychlé progresse onemocnění a velmi krátké doby remise u CLL [166]. V celé řadě studií komplexní karyotypy asociují s progresivním onemocněním, negativní prognózou, rezistencí vůči terapii a kratším přežíváním pacientů [46, 51, 134, 167-171]. Přítomnost komplexního karyotypu koreluje jednak s nemutovaným *IGHV*, pozitivitou buněk na znak CD38 a ZAP-70 [48], ale také chromozomovými translokacemi [51] a nefunkčními telomerami, které vedou k defektům v opravách poškozené DNA a zároveň v apoptóze. Komplexní karyotyp se může vyskytovat jak v době diagnózy CLL, tak v době relapsu nebo progresse onemocnění, kdy vzniká v rámci klonálního vývoje (CE) [172]. U CE se výrazně uplatňuje význam předchozí léčby, avšak bylo také zjištěno, že se dané změny dominující v komplexním karyotypu v době relapsu nacházejí u pacientů i v době před terapií. Uvádí se, že následkem mutace *TP53* bývají

součástí komplexních karyotypů velmi složité patologické klony, které se v době relapsu stávají dominantními [166]. Studium vlivu komplexního karyotypu (CK) a delecí genů *ATM* a *TP53* byl prokázán vliv CK a delecí genů *TP53* na OS, ale rozdíl mezi těmito skupinami již signifikantní nebyl [173, 174]. I když byla pozorována tendence k horšímu přežívání u pacientů s CK a zároveň delecí/mutací genu *TP53* v éře imunochemoterapie [174], Thompson a kol. uvádí CK jako silnější prediktor u refrakterních/relabovaných pacientů léčených ibrutinibem [175]. Dle recentní studie Baliakas a kol. bylo doporučeno rozlišení pacientů s komplexním karyotypem do několika skupin: 1. pacienti s CK a současně trizomií chromozomů 12 a 19 (mají velmi indolentní průběh nemoci), 2. – 3. pacienti se třemi, resp. čtyřmi změnami v karyotypu bez delecce/mutace genu *TP53* (taktéž delší přežívání), 4. pacienti s ≥ 5 aberacemi (kteří měli uniformně velmi agresivní průběh nezávisle na ostatních prognostických markerech jako např. mutační stav *IGHV* nebo mutace/delece *TP53*) [176].

1.2.6 Léčba

Klasická cytogenetika (G-pruhování) a FISH jsou v dnešní době již rutinně využívané metody k detekci cytogenetických a molekulárně-cytogenetických aberací. Význam těchto změn je nepopiratelný a jednotlivé abnormality mají jak prognostický, tak i prediktivní význam. Pacienti s delecí 11q nebo 17p se řadí do skupiny s nejvyšším prognostickým rizikem, kam spadají i pacienti s komplexním karyotypem, kteří nereagují na léčbu standardními režimy nebo brzy po ukončení léčby relabují. Vyšetření chromozomových změn metodou FISH (delece 11q, 13q, 17p a trizomie chromozomu 12) před zahájením první linie léčby a také před každou novou linií léčby se stalo součástí diagnostických doporučení České skupiny pro chronickou lymfocytární leukémii (ČSCLL) [177].

Léčba CLL byla dříve postavena na základě spíše neúčinných přístupů, jako je radioterapie nebo léčba alkylačními agens (např. chlorambucil). Nicméně v posledních dvou dekadách jsme svědky revoluce v léčbě CLL. Prvním převratným objevem byla na konci minulého století purinová analoga (nejčastěji používaný fludarabin), zejména pak kombinace s rituximabem (chimerickou monoklonální anti CD20 protilátkou) [170, 178]. Kombinace fludarabin + cyklofosfamid + rituximab (FCR) je standardní první linií léčby u mladších a „fit“ pacientů dodnes. U starších nemocných je možnou

variantou léčba bendamustin + rituximab, která není tolik toxická [179]. Uvedené kombinace navodily vysoké procento odpovědí na léčbu i kompletních remisí. Nicméně u pacientů s delecí krátkého ramene chromozomu 17, popř. mutací genu *TP53*, delecí dlouhého ramene chromozomu 11 nebo komplexním karyotypem byla účinnost této léčby velmi omezená.

Pochopením molekulárních drah a patogeneze CLL došlo v posledním desetiletí k objevu hned několika cílených léků, které se zdají být efektivní i u pacientů s nepříznivými cytogenetickými změnami. Jedná se o inhibitory Brutonovy kinázy (BTK) – ibrutinib, delta izoformy fosfatidyl-inozitol-3-kinázy (PI3K δ) – idelalisib a BH3 mimetikum – venetoklax.

Ibrutinib je inhibitor Brutonovy kinázy, která je součástí signální dráhy B-buněčného receptoru. Díky inhibici fosforylace BTK dochází i k přerušení následných molekulárních drah vedoucích k přežívání patologických B-lymfocytů (ERK1/2, PI3K, NF κ B). Zároveň dochází k zamezení proliferace CLL buněk, blokadě signálů z mikroprostředí a kontaktu CLL buněk se stromálními buňkami, čímž zabraňuje CLL buňkám v uhníždění v mikroprostředí kostní dřeně nebo lymfatických uzlinách [180]. Díky tomu po zahájení terapie ibrutinibem migrují buňky z kostní dřeně a lymfatických uzlin do periferní krve a přechodně se tak zvyšuje lymfocytóza v krevním obraze pacientů [181].

Idelalisib je inhibitor delta izoformy fosfatidyl-inozitol-3-kinázy (PI3K δ), která funguje jako přenašeč signálu z povrchových receptorů B-lymfocytu. Její inhibicí tak dochází k inhibici chemotaxe a uhníždění CLL buněk v mikroprostředí, snížení sekrece chemokinů stromálními buňkami a redukcí „pro-survival“ signálů z BCR nebo NK buněk [182, 183].

Venetoklax funguje jako inhibitor bcl2 proteinu, který se váže na jeho BH3 doménu (BH3 mimetikum). Bcl2 je antiapoptotický protein, jehož exprese je zvýšená u všech CLL pacientů a způsobuje tak rezistenci vůči apoptóze a akumulaci buněk způsobující lymfocytózu [84, 184]. Díky venetoklaxu dochází k permeabilizaci membrány mitochondrií, aktivaci kaspáz a indukci apoptózy [185].

V běžné praxi se léčba pacientů ihned po stanovení diagnózy nezahajuje. Většinou se čeká na progresi onemocnění či jeho symptomy. Nicméně pacienti v pokročilém stádiu onemocnění (C dle Bineta, III-IV dle Raie) jsou indikováni k léčbě téměř vždy, u pacientů ve středním stádiu (B dle Bineta, I-II dle Raie) se léčba zahajuje až po

prokázané klinické manifestaci onemocnění. Všeobecně se indikace k léčbě CLL řídí mezinárodně uznávanými kritérii iwCLL 2018 [186, 187].

K zahájení léčby je nutné splnit nejméně jedno z následujících kritérií:

1. selhání kostní dřeně (zhoršení nebo rozvoj anémie a/nebo trombocytopenie);
2. masivní, progresivní nebo symptomatická splenomegalie;
3. masivní, progresivní nebo symptomatická lymfadenopatie;
4. progresivní lymfocytóza (vzestup nejméně o 50 % během 2 měsíců nebo LDT kratší než 6 měsíců);
5. autoimunitní anémie a/nebo trombocytopenie špatně odpovídající na léčbu;
6. nejméně jeden z následujících systémových příznaků souvisejících s onemocněním:
 - a) nechtěný úbytek hmotnosti o ≥ 10 % v průběhu předchozích 6 měsíců,
 - b) významná únava,
 - c) horečky nad 38 °C po dobu nejméně 2 týdnů (bez průkazu infekce),
 - d) noční pocení po dobu delší než 1 měsíc (bez průkazu infekce).

První linií léčby u pacientů v dobrém stavu stále zůstává režim FCR [177, 188]. Další léčebnou možností je podání alemtuzumabu (anti-CD52 protilátka), kombinace bendamustin + rituximab (BR), popřípadě rituximab + cyklofosamid + dexametazon (RCD) či obdobný režim s vysokodávkovanými kortikoidy. U pacientů s přidruženými chorobami, a tudíž nevhodnými k léčbě režimem FCR, jsou hlavními možnostmi léčby kombinace chlorambucilu s antiCD20 protilátkou (obinutuzumab, ofatumumab nebo rituximab), popř. BR. Alternativou jsou opět alemtuzumab, bendamustin + ofatumumab, nízkodávkované FCR, RCD či obdobný režim s vysokodávkovanými kortikoidy nebo také ibrutinib. U pacientů s delecí/mutací genu *TP53* je hlavní léčebnou možností ibrutinib nebo idelalisib + rituximab, a to jak u pacientů v dobrém stavu, tak u pacientů s komorbiditami. Schématické znázornění první linie léčby je uvedeno na str. 33 [177, 187].

V případě refrakterního nebo relabovaného (R/R) onemocnění se léčba odvíjí zejména od doby relapsu od ukončení předchozí linie léčby. Pokud k relapsu dochází po více než 2–3 letech, je možné zopakování původní léčby nebo je vhodné zvážit léčbu kombinacemi BR, FCR, popř. nízkodávkovaného FCR. Pokud se jedná o refrakterní CLL či k relapsu dochází dříve než po 2–3 letech, nabízí se tyto možnosti: ibrutinib,

idelalisib + rituximab, venetoklax, popř. alemtuzumab, BR, FCR (v případě komorbidních pacientů nízkodávkované FCR), ofatumumab nebo RCD či obdobný režim s vysokodávkovanými kortikoidy. V případě „fit“ pacientů je ještě možné zvážit léčbu platinovými režimy či alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Alogenní transplantace by měla být zvažována zejména u pacientů s rizikovým onemocněním a nepříznivým klinickým průběhem (pacienti s delecí/mutací *TP53*, nemocní refrakterní na purinová analoga nebo s brzkým relapsem po chemoimunoterapii). Schéma léčebných doporučení pro pacienty s R/R CLL je uvedeno na str. 34 [177, 187].

Schéma léčebného postupu v 1. linii léčby, vypracováno dle ČSCLL doporučení [177]:

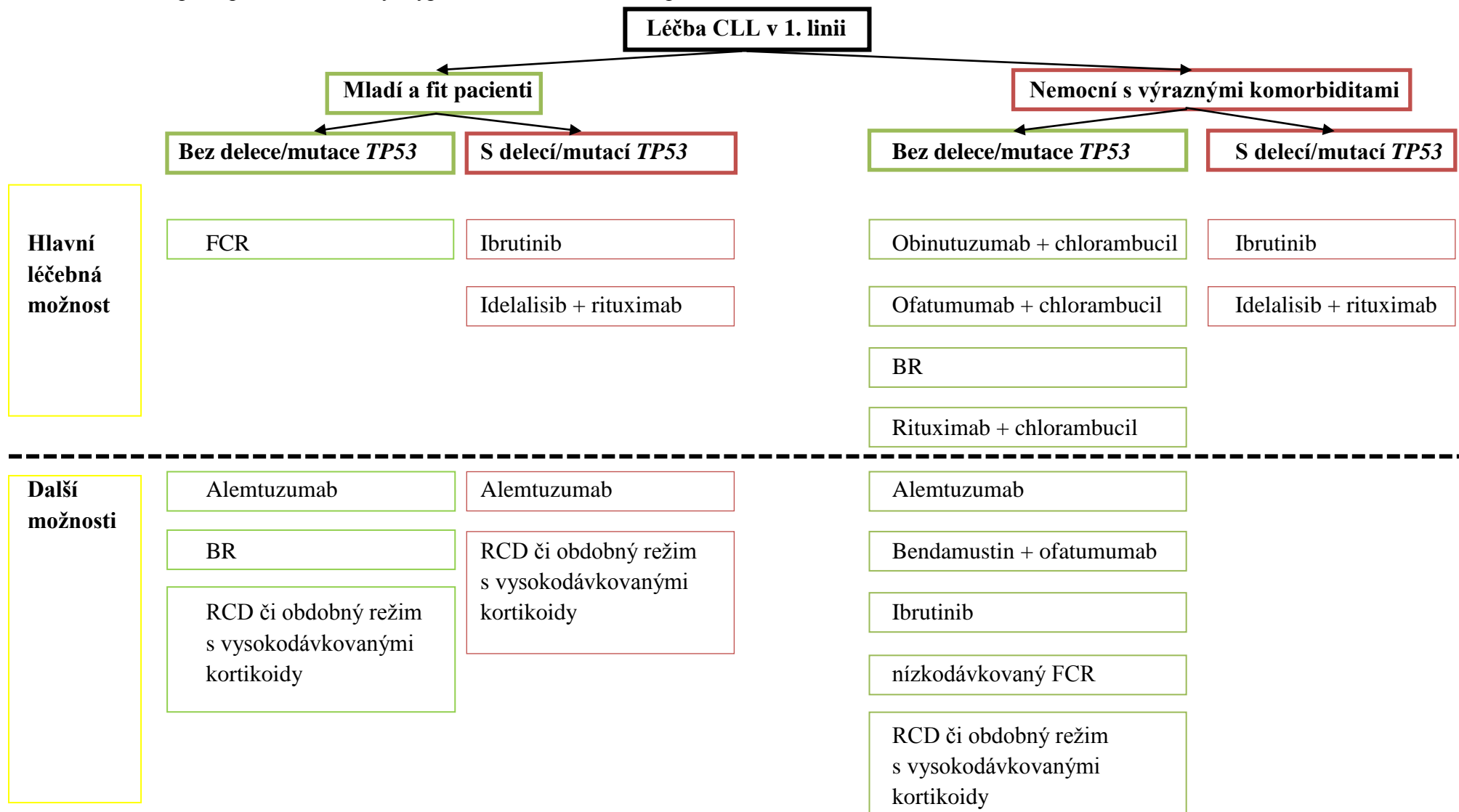
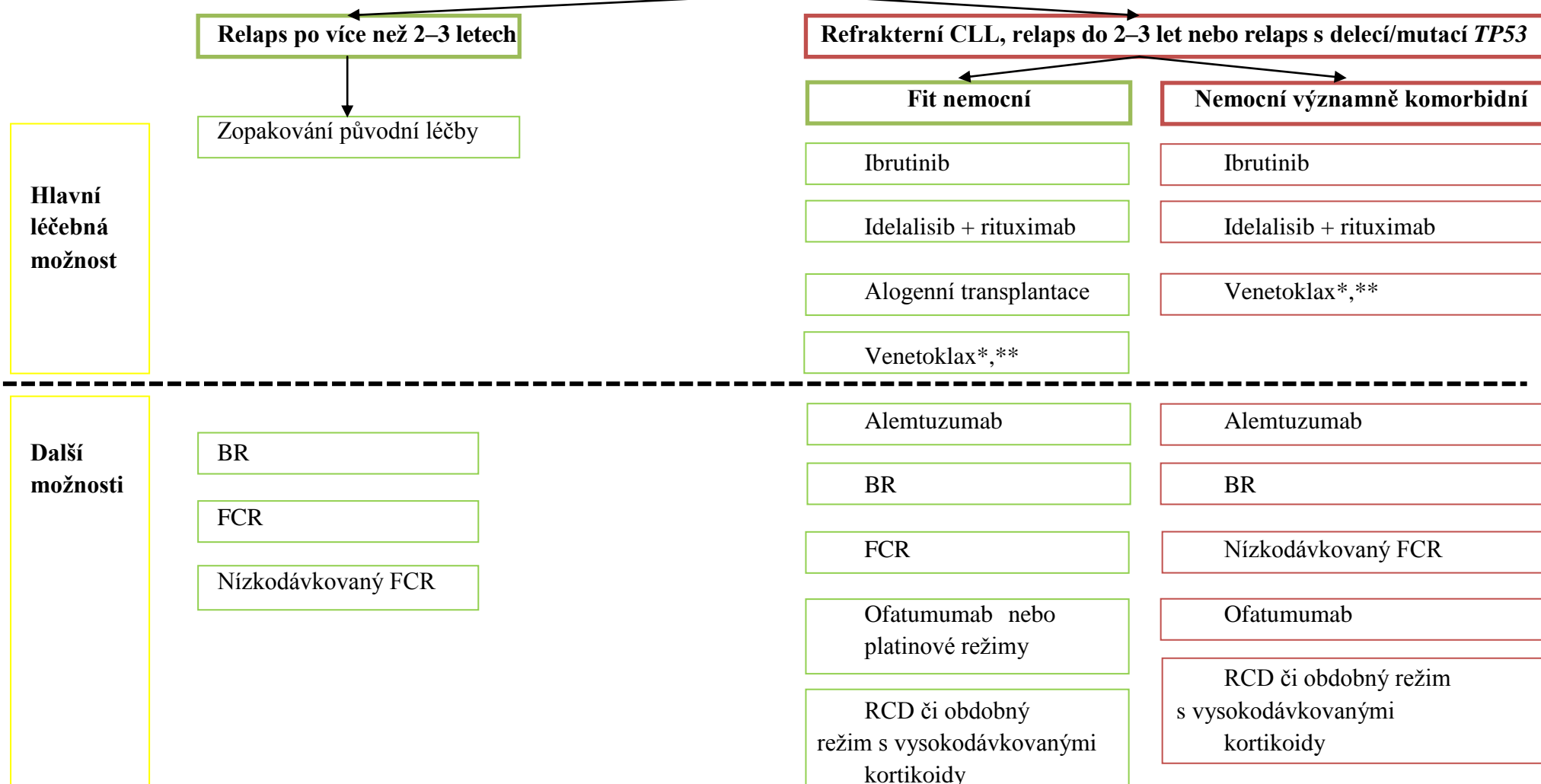


Schéma léčebného postupu v případě refrakterní/relabované CLL, vypracováno dle ČSCLL doporučení [177]:

Léčba v případě refrakterní CLL nebo relapsu onemocnění



*U pacientů s delecí/mutací TP53 po selhání či při nemožnosti léčby inhibítorem BCR.

**U pacientů bez delece/mutace TP53 po selhání chemoimunoterapie i léčby BCR inhibítorem.

1.2.7 Richterova transformace (Richterův syndrom)

Richterův syndrom (RS) je vzácná transformace CLL, která se vyskytuje u 5–10 % pacientů. Většinou se jedná o transformaci do DLBCL, vzácněji do Hodgkinova lymfomu (HL) [189-191]. Výjimečně může CLL také transformovat do lymfomu pláštěvých buněk [192], imunoblastického [193] nebo plazmablastického lymfomu či se dokonce transdiferencovat do hystiocytárního sarkomu [194]. Prognóza RS je velmi nepříznivá a je charakterizována velmi krátkým celkovým přežíváním [189, 190]. RS může vzniknout *de novo* („unrelated RS“ – klonálně nepříbuzný) nebo transformací původního CLL buněčného klonu (s totožnou *IGHV* sekvencí, „related RS“ – klonálně příbuzný) [191].

Transformace CLL do HL je většinou spjata s EBV infekcí (Epstein-Baar virus), *IGHV* bývá u těchto pacientů ve většině případů mutované a ve srovnání s variantou transformované CLL do DLBCL vzniká častěji *de novo* [191, 195].

Všeobecně mají pacienti s rizikem RS při diagnóze pokročilé stádium nemoci, lymfadenopatii (≥ 3 cm), vyšší hladinu laktát-dehydrogenázy, nemutované *IGHV* a stereotypní BCR receptor (subset #8, nejčastěji *IGHV4-39/IGHD6-13/IGHJ5*), pozitivní expresi CD38 a ZAP-70, absenci delece oblasti 13q14 [190, 196] a kratší telomery (< 5000 bp) [197].

Kromě samotné exprese CD38 [190] je rizikovým faktorem i genetický polymorfismus v jeho sekvenci (C>G v regulačním regionu intronu 1). Pacienti s nejvyšší frekvencí G alely mají horší prognózu a vysokou pravděpodobnost rozvoje RS [198].

Zhruba 60–80 % pacientů s RS má aberaci *TP53*, zejména pacienti s klonálně příbuzným RS. U klonálně nepříbuzných DLBCL se delece/mutace *TP53* vyskytují jen ve 20–25 % případů. Druhou nejčastější změnou u pacientů s klonálně příbuzným RS je mutace v genu *NOTCH1* (až 40 % pacientů) [199]. Ve studii autorů Fabbri a kol. byla mutace genu *NOTCH1* prokázána u 8 % pacientů v době stanovení diagnózy CLL, během progresu do RS toto procento vzrostlo na 30 % [200]. Za změny vyskytující se u CLL pacientů výhradně v době transformace jsou považovány aberace genů *CDKN2A/B*, které byly prokázány u cca 30 % případů [201]. *CDKN2A* (9p21) kóduje 2 proteiny: 1. p16INK4A, který funguje jako negativní regulátor buněčného cyklu [202], a 2. ARF, inhibitor *MDM2*, který negativně reguluje p53 [203]. Dalšími častými cytogenetickými aberacemi jsou abnormality genu *MYC* (duplikace/přestavby) [124,

204], trizomie chromozomu 12 [205], dále zmnožení v oblasti krátkých ramen chromozomu 2 (geny *NMYC*, *REL*) a ztráty v oblasti krátkých ramen chromozomu 8 (8p23.1–8p21.2, 8p21.2) [206].

Aberace genů *TP53*, *CDKN2A/B* a *MYC* se často vyskytují společně, nicméně trizomie 12 přítomná až u 30 % pacientů s RS se vzájemně s těmito změnami vylučují. Aberace genu *TP53* je často doprovázena delecí oblasti 13q14 a genu *RBI*. Kromě již dříve uvedených aberací, dalšími změnami v počtech kopií u RS bývají delece v oblastech dlouhých ramen chromozomu 7 (7q31.31–7q36.3) a 14 (14q23.2–14q32.33) a amplifikace v oblasti dlouhých ramen chromozomů 11, 13 a 18 [201].

Pacienti s RS jsou charakterizováni komplexním karyotypem a na základě společného výskytu jednotlivých aberací určili autoři Chigrinova a kol. [207] 2 hlavní linie vzniku RS:

1. hlavní linie charakterizovaná deregulací buněčného cyklu díky inaktivaci *TP53* a *CDKN2A*, doprovázená amplifikacemi/přestavbami genu *MYC*;
2. linie charakterizovaná trizomií chromozomu 12 s mutací *NOTCH1* až u 71 % pacientů;
3. linie se značnou heterogenitou v genetických změnách.

Pacienti s klonálně nepříbuzným DLBCL mají *TP53* delecí/mutaci jen ve 20–25 % případů [124], nemají mutace v genu *NOTCH1* ani aberace genu *MYC*. Celkově se klonálně nepříbuzný RS chová stejně jako *de novo* vzniklý DLBCL. Má jiné genetické aberace a taktéž lepší prognózu [199].

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

1. Vypracovat literární rešerši na téma chronické lymfocytární leukémie se zaměřením na molekulárně-cytogenetické aberace.
2. U pacientů s komplexním karyotypem určit:
 - a) incidenci a vliv na celkové přežívání,
 - b) frekvenci zasažených chromozomů a typy nejčastějších změn zahrnutých v detekovaných komplexních karyotypech, současně určit také vliv jednotlivých změn na celkové přežívání,
 - c) souvislost s delecemi 11q a/nebo 17p, popř. mutacemi *TP53* a posoudit, zda tyto aberace dále zhoršují přežívání pacientů s komplexním karyotypem,
 - d) asociace s dalšími prognostickými charakteristikami (mutační stav *IGHV*, pohlaví a věk pacientů).
3. U pacientů s delecí 6q stanovit:
 - a) incidenci a vliv na celkové přežívání,
 - b) minimální deletovanou oblast (MDR) pomocí arrayCGH,
 - c) kandidátní geny v rámci MDR, u těchto dále určit jejich relativní expresi.
4. U pacientů se zmnožením krátkých ramen chromozomu 2 vyhodnotit:
 - a) incidenci a vliv na celkové přežívání,
 - b) jeho rozsah pomocí arrayCGH,
 - c) nejčastěji přidružené cytogenetické změny.

3. SOUBOR PACIENTŮ A METODY

3.1 Pacienti

Všichni pacienti se stanovenou diagnózou CLL dle kritérií iwCLL 1996 a 2008 [12, 208] byli vyšetřeni metodami konvenční a molekulární cytogenetiky v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky LF UP v Olomouci a FN Olomouc během let 1996 a 2018 a poskytli informované souhlasy schválené etickou komisí. Bližší charakteristika souborů pacientů je uvedena v jednotlivých podkapitolách výsledků. U pacientů CLL byla pro cytogenetické vyšetření nejčastěji odebrána periferní krev (PK), popř. kostní dřeň (KD) nebo lymfatická uzlina (LU).

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace biologického materiálu

Periferní krev (PK) a kostní dřeň (KD) se odebírá do odběrové zkumavky s protisrážlivým činidlem (heparinem). Buňky periferní krve byly kultivovány v RPMI 1640 mediu nebo BM mediu (Gibco, Life technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA; Biological Industries, Cromwell, Connecticut, USA) bez stimulace, popř. za přítomnosti DSP30 (TIBMolbiol, Berlín, Německo) nebo ECAMPO10 (EuroClone, Pero, Itálie) a interleukinu 2 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo) po dobu 72 hodin. Buňky kostní dřeně nebo lymfatických uzlin byly kultivovány v RPMI 1640 nebo BM mediu 24 hodin. Kultivace PK, KD nebo LU probíhala při 37 °C za přítomnosti CO₂. Na posledních 24 hodin byl do kultivačních nádob přidán colcemid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

3.2.2 Konvenční cytogenetika (G-pruhování)

Vyšetření bylo provedeno na metafázích biologického materiálu všech pacientů. K pruhování chromozomů byly použity standardní metody G-pruhování [209, 210]. Hodnoceno bylo nejméně 10 metafází, méně než 10 hodnotitelných mitóz bylo považováno za neúspěšné vyšetření. Karyotypy byly následně sestaveny pomocí softwaru Ikaros (MetaSystems, Altlussheim, Německo) a zapsány dle platné

cytogenetické nomenklatury (ISCN), aktuální verze ISCN 2016 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) [211].

3.2.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Všichni pacienti byli vyšetřeni metodou FISH k detekci delecí genů *ATM*, *TP53*, oblastí 13q14 (D13S319 nebo *DLEU1*, *DLEU2*), 13q34 (*LAMP1*), 6q21, trizomie chromozomu 12, duplikace genu *MYC* a přestavby genu *IGH* pomocí komerčně dostupných sond (Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, USA; Kreatech Diagnostics, Vlierweg, Nizozemí; MetaSystems). Pro určení dalších numerických aberací, přestaveb, případně komplexních karyotypů byly použity další lokusově specifické, centromerické, celochromozomové nebo BAC sondy (Cambio, Cambridge, Velká Británie; Abbott Molecular; Dako, Glostrup, Dánsko; MetaSystems; BlueGnome, Cambridge, Velká Británie), popř. mnohobarevná FISH (mFISH, 24XCyte DNA probe Kit, MetaSystems). Ve všech případech bylo postupováno dle návodu výrobce dané sondy. Výsledky hybridizace byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60 a softwaru ISIS (MetaSystems). Při hodnocení interfázních jader bylo zpravidla hodnoceno 300 buněk, hodnota cut off pro patologický nález byla stanovena pod 5 % hodnocených buněk.

3.2.4 Array komparativní genomová hybridizace (arrayCGH)

DNA izolovaná z PK, KD nebo LU byla vyšetřena metodou arrayCGH pomocí následujících platform: 1Mb 3 K platforma (Leiden University Medical Center, Leiden, Nizozemí; Department of Human Genetics, Catholic University Leuven, Leuven, Belgie), CytoChip ISCA 4 x 44 K (BlueGnome), Human Genome CGH Microarray Kit, 4 x 44 K (Agilent, Santa Clara, Kalifornie, USA) a SurePrint G3 Hmn CGH + SNP 4 x 180 K Microarray Kit (Agilent). Ve všech případech byly následovány postupy výrobce jednotlivých čipů. Výsledky byly hodnoceny pomocí softwaru BlueFuse Multi software (BlueGnome), Agilent Genomic Workbench nebo Agilent CytoGenomics (Agilent).

3.2.5 Statistické metody

Kaplan-Meierovy křivky přežívání (u souboru nemocných se zmnožením krátkého ramene chromozomu 2) byly konstruovány pomocí statistického softwaru GraphPad Prism (verze 8.2.0). Celkové přežívání bylo definováno jako doba od stanovení

diagnózy do data posledního sledování nebo data úmrtí pacienta z jakékoliv příčiny. Jako statisticky významná byla považována p hodnota $< 0,05$. Statistické výsledky dalších studií byly vypracovány externími pracovišti a konkrétní informace o použitém softwaru a metodách jsou uvedeny v příslušných publikacích.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Komplexní karyotyp (CK)

Výsledky této studie jsou uvedeny v publikaci Kruzova L, Schneiderova P, Holzerova M, Vatulikova M, Divoka M, Turcsanyi P, Urbanova R, Kudelka M, Radvansky M, Kriegova E, Papajik T, Urbankova H: Complex karyotype as a predictor of high-risk chronic lymphocytic leukemia: A single center experience over 12 years. *Leukemia Research*, 2019; 85; viz Příloha č. 1.

4.1.1 Soubor pacientů

Celkem 644 neléčených CLL pacientů (diagnostikovaných dle iwCLL doporučení z let 1996 a 2008 [12, 208]) bylo vyšetřeno v našem centru během let 1996 až 2017. Komplexní karyotyp (≥ 3 chromozomové abnormality v jednom patologickém klonu) byl detekován u 79/644 pacientů (12,3 %). Do studie bylo zařazeno i 11 pacientů s neúspěšnou nebo neinformativní konvenční cytogenetikou, u kterých byl prokázán komplexní karyotyp pomocí interfázní FISH. U 4 z těchto pacientů byly prokázány minimálně 3 abnormality v nejméně 70 % buněk a u 7 pacientů byl výskyt aberací v jednom klonu prokázán dalším vyšetřením FISH s průkaznou kombinací sond.

Soubor tvořilo 57 mužů a 22 žen s mediánem věku v době diagnózy 64 let (rozmezí 34–87 let). Komplexní karyotyp byl prokázán u 59 pacientů (75 %) v době diagnózy a u 20 pacientů (25 %) před zahájením terapie (s rozmezím 6–128 měsíců). Mutační stav *IGHV* byl vyšetřen u 76/79 pacientů, 16 pacientů (20,3 %) mělo mutovaný *IGHV* stav, z toho 6 pacientů (7,6 %) neslo subgen *IGHV3-21*, a 60 pacientů (75,9 %) mělo nemutovaný stav *IGHV*. Základní charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 1 (Tab. 1).

Tab. 1: Základní charakteristika pacientů s komplexním karyotypem

Pohlaví	N (%)
Muži	57 (72)
Ženy	22 (28)
Věk v době diagnózy	Medián (rozmezí)
	64 (34–87)
Stádium dle Bineta	N (%)
A	24 (30,4)
B	28 (35,4)
C	23 (29,1)
Neurčeno	4 (5,1)
IGHV stav	N (%)
Mutovaný	10 (13)
Mutovaný (<i>VH3-21</i>)	6 (8)
Nemutovaný	60 (76)
Nevyšetřeno	3 (4)
Přítomnost CK	N (%)
V době diagnózy	59 (75)
Před léčbou	20 (25)

*N = počet pacientů

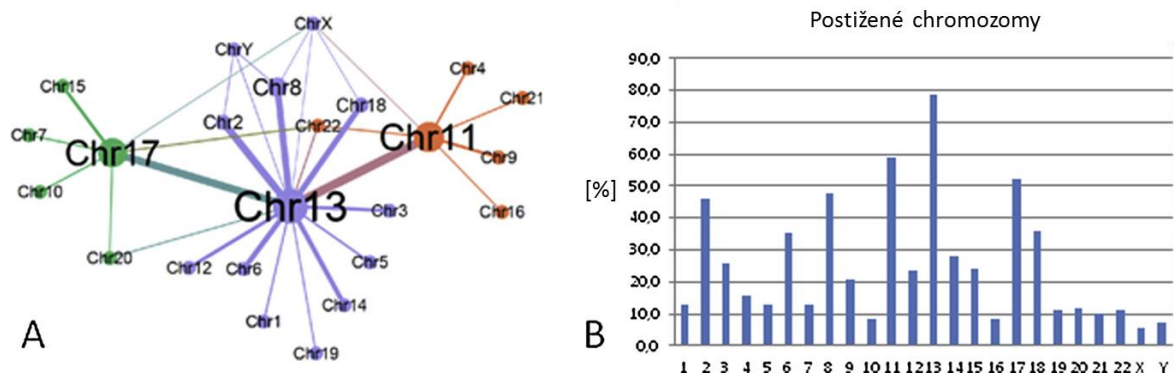
Léčeno bylo celkem 69 pacientů s mediánem doby do první léčby 197 dní (tedy 6,5 měsíce). Imunochemoterapií s kurabilním potenciálem (jejíž součástí byl fludarabin nebo bendamustin) bylo léčeno 51 pacientů. Pět pacientů obdrželo pouze chemoterapii (v době, kdy nebyla imunoterapie rutinní záležitostí), 4 pacienti BCR inhibitory v první linii léčby (3x R-idelalisib, 1x ibrutinib) a 9 pacientů bylo léčeno pouze paliativně (5x monoterapie leukeranem, 3x kortikosteroidy, 1x monoterapie alemtuzumabem). Deset pacientů nebylo léčeno – 6 pacientů z důvodu velmi špatného celkového zdravotního stavu a 4 pacienti zatím k léčbě nebyli indikováni.

4.1.2 Výsledky

Cytogenetické výsledky

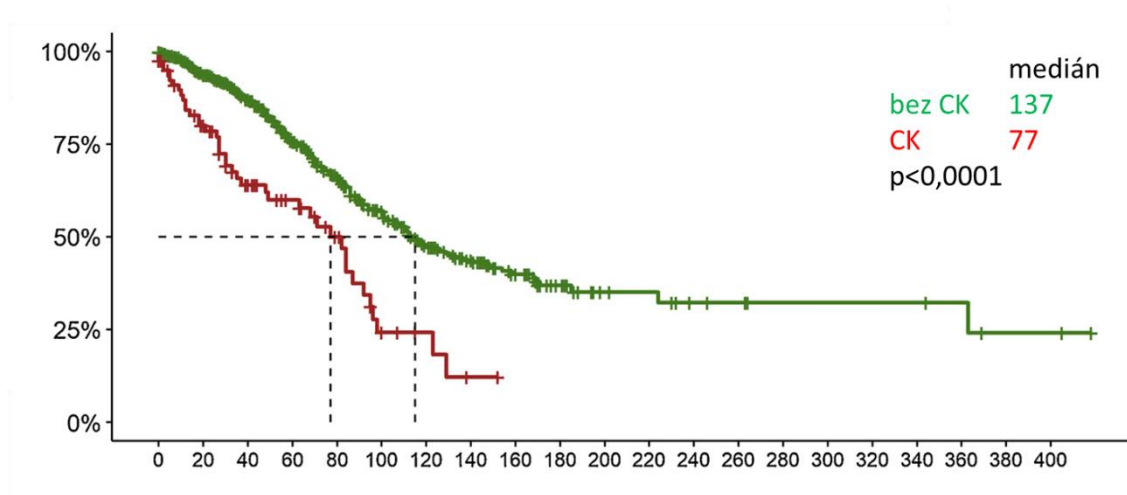
Nejčastěji detekovanou rekurentní aberací u pacientů s komplexním karyotypem byla delece oblasti 13q14 (68 %), dále delece oblastí 11q22 (43 %), 17p13 (35 %) a duplikace 8q24 (27 %). Dalšími častými cytogenetickými abnormalitami byly duplikace krátkého ramene chromozomu 2 (33 %), delece 6q21 (14 %), trizomie chromozomu 12 (10 %) a přestavba genu *IGH* (2,5 %). Výsledky metod konvenční cytogenetiky, FISH a arrayCGH jsou uvedeny v tabulkách 2 (str. 48) a 3 (str. 55).

Nejčastěji postižené chromozomy a současný výskyt detekovaných abnormalit v jednotlivých klonech jsou uvedeny v obrázku 2.

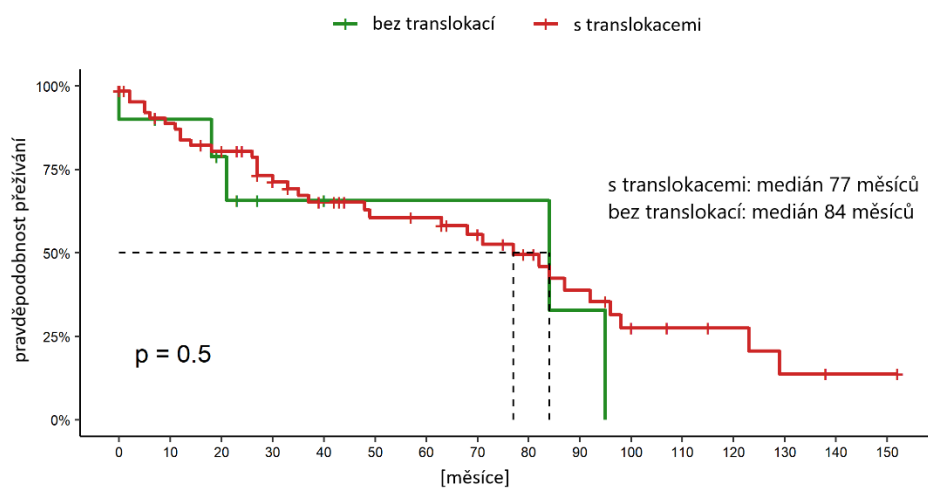


Obrázek 2: A) Schéma nejčastěji postižených chromozomů v komplexních karyotypech a zobrazení společného výskytu (čím větší zobrazení chromozomu, tím častější jeho změna v rámci CK; silnější linka zobrazuje častější společný výskyt aberací příslušných chromozomů; nejčastěji postiženými chromozomy jsou chromozomy 17, 13 a 11, aberace chromozomu 13 jsou často doprovázeny aberacemi chromozomů 11 nebo 17, naopak aberace chromozomů 11 a 17 se společně téměř nevyskytují; B) Grafické zobrazení nejčastěji postižených chromozomů

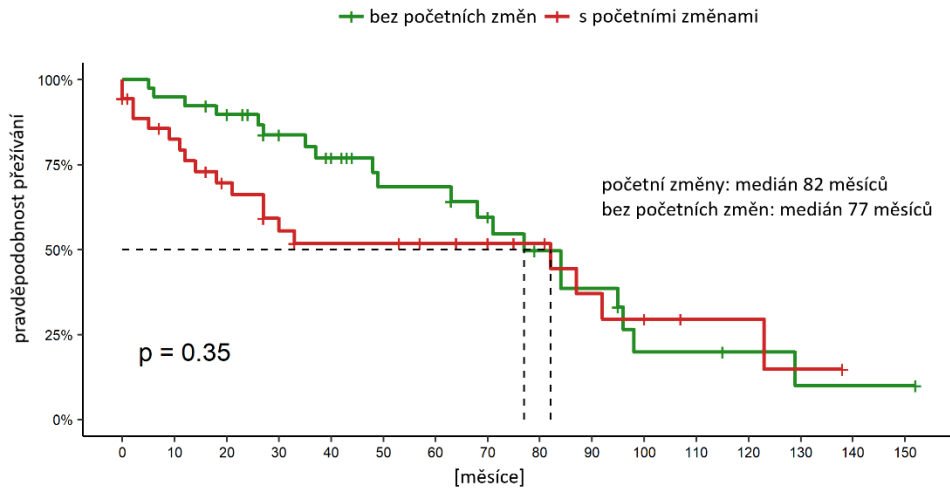
Statistická analýza prokázala kratší OS u pacientů s komplexním karyotypem ve srovnání s pacienty bez komplexního karyotypu (medián OS u pacientů s CK byl 77 měsíců, medián OS pacientů bez CK, kam bylo zahrnuto 565 nemocných, bylo 115 měsíců; $p < 0,0001$; viz Obrázek 3). Translokace, numerické změny a dicentrické chromozomy jako součást CK již na OS vliv neměly ($p = 0,5$, $p = 0,35$ a $p = 0,62$; viz Obrázky 4–6). Nebyla prokázána ani souvislost mezi počtem aberací (3–4 změny vs. 5 a více změn) a celkovým přežíváním pacientů ($p = 0,35$).



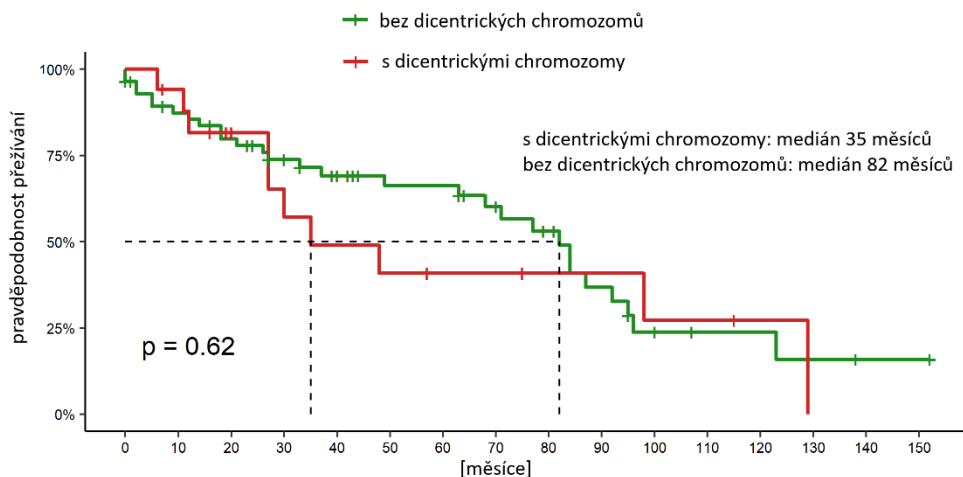
Obrázek 3: Celkové přežívání u pacientů s komplexním karyotypem vs. bez komplexního karyotypu



Obrázek 4: Celkové přežívání pacientů s komplexním karyotypem s translokacemi vs. bez translokací



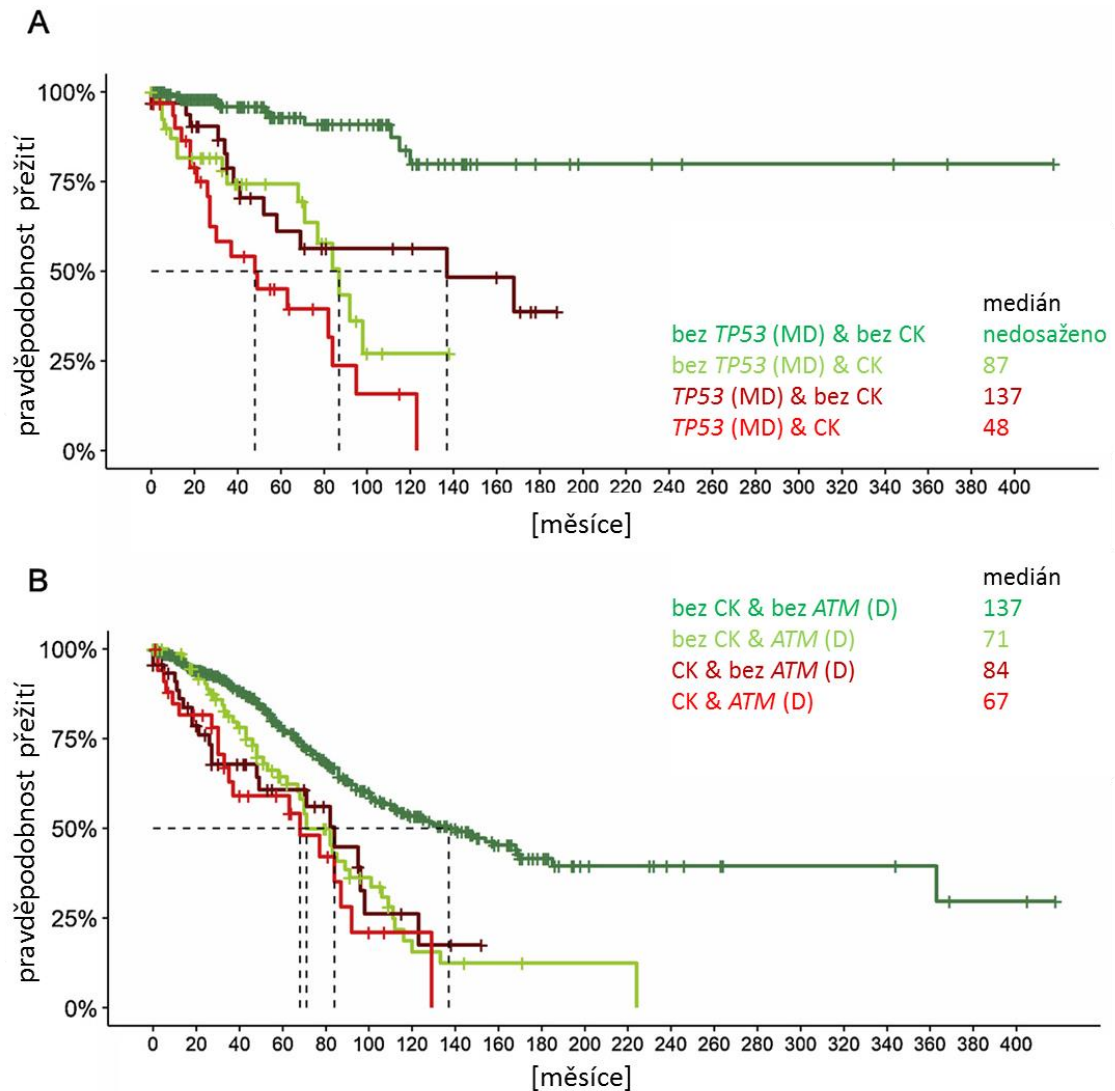
Obrázek 5: Celkové přežívání pacientů s komplexním karyotypem s početními změnami chromozomů vs. bez početních změn



Obrázek 6: Celkové přežívání pacientů s komplexním karyotypem s dicentrickými chromozomy vs. bez dicentrických chromozomů

Celkem u 32 pacientů byly prokázány aberace (delece a/nebo mutace) genu *TP53*. Delece *TP53* byla prokázána u 28 pacientů s CK (35 %) ve srovnání s 18 pacienty (3 %) v kontrolní skupině pacientů bez CK. Mutace genu *TP53* byly detekovány u 24 pacientů z 69 vyšetřených (35 %); 19 pacientů z těchto 69 pacientů (28 %) mělo současně deleci i mutaci genu. Gen *ATM* byl deletován u 34 pacientů s CK (43 %) oproti 79 pacientům bez CK (14 %). U 5 pacientů pak byla prokázána delece obou genů současně.

Přežívání pacientů s CK, jejichž součástí byla aberace genu *ATM* nebo *TP53* nebyla horší ve srovnání s pacienty s CK bez těchto abnormalit (48 měsíců/68 měsíců vs. 87 měsíců/84 měsíců; $p=0,076/p=0,49$). Avšak pacienti bez CK s delecemi genu *ATM* nebo *TP53* (79 pacientů/33 pacientů) měli srovnatelné OS s pacienty s CK ($p=0,37/p=0,78$). Pacienti s CK současně s delecí/mutací *TP53* měli horší OS ve srovnání s pacienty bez CK s delecí *TP53* (48 měsíců vs. 137 měsíců; $p=0,0084$; viz Obrázek 7).



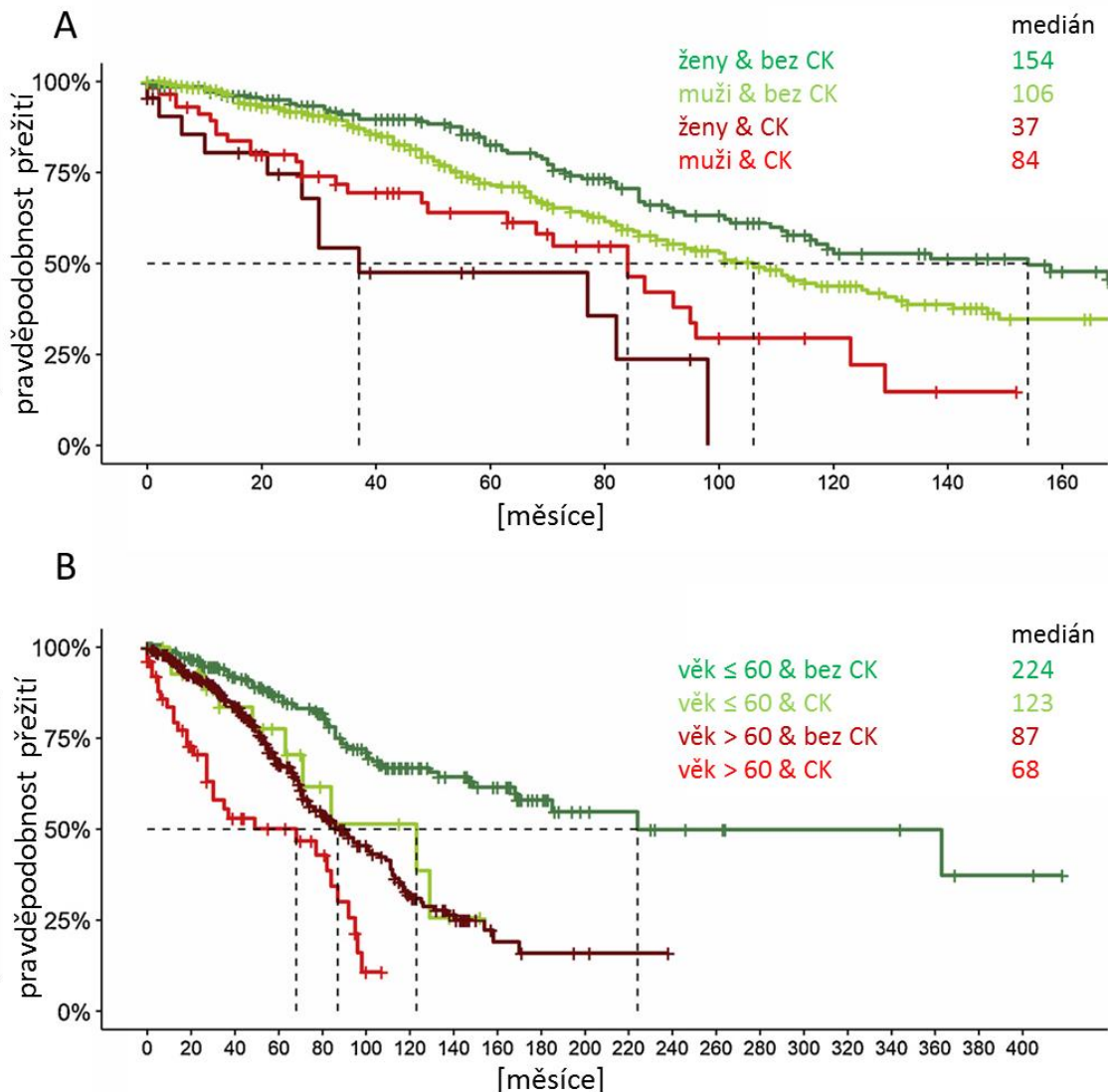
Obrázek 7: Celkové přežívání u pacientů s/bez komplexních karyotypů rozdělených do podskupin dle: **A)** přítomnosti/nepřítomnosti delece/mutace *TP53* (MD)*; **B)** přítomnosti/nepřítomnosti delece *ATM* (D)**

* Do analýzy byli zařazeni pacienti vyšetření metodami FISH ke stanovení delece 17p a NGS k určení mutace *TP53*

** Do analýzy zařazeni pacienti vyšetření metodou FISH k určení delece 11q

Vliv pohlaví a věku pacientů na celkové přežívání

Taktéž byla provedena analýza celkového přežívání u pacientů s CK s ohledem na pohlaví a věk. Nejkratší přežívání bylo prokázáno u žen s CK (ve srovnání s ženami bez CK: 37 měsíců vs. 154 měsíců; $p < 0,0001$), rozdíl mezi muži s CK a muži bez CK nebyl tak markantní (84 měsíců vs. 106 měsíců; $p = 0,0049$). Nicméně statisticky signifikantní rozdíl v celkovém přežívání mezi muži a ženami s CK prokázán nebyl (37 měsíců vs. 84 měsíců; $p = 0,14$; viz Obrázek 8A). Kratší přežívání ale bylo prokázáno u pacientů s CK starších 60 let (pacienti s CK starší 60 let vs. pacienti s CK mladší 60 let: 68 měsíců vs. 123 měsíců; $p = 0,0075$; viz Obrázek 8B).



Obrázek 8: Celkové přežívání u pacientů s/bez komplexních karyotypů rozdělených do podskupin dle: **A**) pohlaví (muži/ženy); **B**) věku (≤ 60 let/ > 60 let)

Tab. 2: Výsledky FISH a závěrečné karyotypy

Pacient č.	Věk v době diagnózy	Mutace TP53	Mutační stav IGHV	Výsledek iFISH (panel CLL)	Závěrečný karyotyp
M/1†	65	ne	UNM	del(13q),+12	46,XY,der(4)t(3;4)(?;q?),?del(13)(q14.2q14.3),del(15)(q14q15.1)[7]/ 47,XY,+12,del(13)(q14.2q14.3)[5]/ 47,XY,?del(13)(q14.2q14.3),+19[2]/ 46,XY[5]
M/2†	64	ne	MU (VH3-21)	dup(8q),del(13q)*	46,XY,der(Y)t(Y;8)(q?12;q?23)dup(8)(q22.2q24.3),del(13)(q14.2q14.3)[11]/ 46,XY,dic(2;18)(q?12;p?18),+2[4]/ 46,XY[2]
M/3†	34	ne	UNM	del(11q),del(13q)	46,XY,der(11)del(11)(q14.1q25)t(2;11)(q14.1;p?15)dup(2)(p25.3p21)dup(2)(2p16.3p15),del(13)(q14.11q14.3)[5]/ 46,XY[5]
M/4	44	ne	UNM	+12	47,XY,+12[2]/ 47,XY,der(3)del(3)(p26.3p25.3)t(3;3)(q21.2;p25.3)dup(3)(q21.2q29),+12,der(15)del(15)(q26.1q26.3)t(2;15)(p14;q26.1)dup(2)(p25.3p14)[52]/ 46,XY[2]
M/5†	73	ano	UNM	del(13q), del(14q),del(17p)	46,XY,der(3),der(7),del(9)(q22.33q34.3),del(14)(q24.1q32.33),del(17)(p13.1)[6]/ 46,XY[5]
M/6	65	ne	UNM	del(11q),+12	47,XY,der(3)t(3;5)(p?26;q?),del(11)(q22.3),+12,der(13)t(4;13)(q?;p?)dup(13)(q21.2q21.32),dup(18)(q23),dup(19)(q13.12q13.2)[11]/ 46,XY[2]
M/7	52	ne	UNM	amp(8q),del(13q), del(17p)	44,XY,dic(6;17)(p?21;p?12),dic(8;15)(q?24;p?11),del(13)(q14),del(17)(p13)[15]
M/8	43	ne	UNM	žádné aberace	47,XY,+i(2)(p11),der(22)t(15;9;22)(q?15;q?11;p?11)[6]/ 46,XY[4]
Ž/9†	71	ne	UNM	del(11q)	45,XX,dic(4;8)(q?11;p?11),del(11)(q?22),der(12)t(9;12)(q?22;p?13),der(17)t(4;17)(q?21;p?13)[12]/ 45,XX,dic(4;8)(q?11;p?11),del(11)(q?22),der(17)t(4;17)(q?21;p?13)[3]/ 46,XX[3]
M/10†	82	ne	UNM	del(6q),dup(8q), del(11q),del(13q)	46,XY,del(6)(q14.3q25.1),del(11)(q14.1q23.3)[26]/ 47,XY,del(6)(q14.3q25.1),t(7;17)(p?22;q?22),+8,del(11)(q14.1q23.3),der(?)ins(?;13)(?;q?32)del(13)(q14.13q14.3)[8]
Ž/11†	58	ano	UNM	dup(11q),del(13q), del(17p)	dup(11q),del(13q), del(17p)*
Ž/12†	61	ne	MU (VH3-21)	dup(8q),del(13q)*	46,XX,+2,dic(2;18)(q11.2;p11.2),der(3)dup(3)(q26.2q29)t(3;3)(p?;q26.2),del(6)(p21p12),del(13)(q14),del(13)(q14)[4]/ 46,XX,idem,der(9)t(8;9)(q24;q?) [2] 46,XX[25]
Ž/13	56	ano	UNM	dup(8q),del(11q), del(13q),del(17p)	dup(8q),del(11q),del(13q),del(17p) *

Pacient č.	Věk v době diagnózy	Mutace TP53	Mutační stav IGHV	Výsledek iFISH (panel CLL)	Závěrečný karyotyp
Ž/14†	65	ano	UNM	dup(8q),del(17p)	44,XX,dic(4;17)(p11.2;p11.2),-9[8]/ 43,XX,dic(4;17)(p11.2;p11.2),?dic(8;18)(p11.2;p11.2),?dic(12;21)(p11.2;?p11.2)[2]/ 46,XY[24]
M/15	60	ne	UNM	del(11q),del(13q)*	47,XY,+i(2)(p10),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q?14),del(13)(q14)[49]/ 46,XY,trp(2)(pterp11),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q?14),del(13)(q14)[5]/ 47,XY,+der(2)del(2)(q10?qter)t(2;?)(q11;?),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q?14),del(13)(q14)[4]/ 46,XY[20]
M/16†	57	ne	UNM	t(14q),del(17p)	46,XY,del(2)(p24),t(6;14)(p25;q32),del(17)(p13)[15]/ 46,XY[5]
M/17†	66	ne	UNM	dup(8q),del(11q), del(13q)	43,XY,der(9)t(9;21)(p?21;q?11)del(9)(p24.3p21.1),der(11)t(13;3;11)(q?14;q?13;q?14)del(11)(q14.3q23.3),-13,del(13)(q14),-15, der(18)t(8;18)(q?22;q?12)del(8)(p23.3p11.1)dup(8)(q21.22q24.3),-21[5]/ 42,XY,-8,der(11)t(13;3;11)(q?14;q?13;q?14)del(11)(q14.3q23.3),-13,del(13)(q14),-15,der(18)t(8;18)(q?22;q?12),-21[2]/ 46,XY,der(12)t(2;12)(q?21;q?32),del(13)(q14)[2]/ 46,XY,del(13)(q14)[2]
Ž/18	73	ne	UNM	del(6q),del(13q), del(17p)	del(6q),del(13q),del(17p) ▪
M/19†	70	ne	UNM	del(11q), del(13q)	dup(2p),del(11q),del(13q) ▪
M/20†	56	ne	UNM	dup(8q),del(11q)	46,XY,i(8)(q10),del(9)(p24.1p21.1),del(11)(q22.3q24.3),del(14)(q11.2q22.3),dup(15)(q26.2q26.3),der(18)t(2;18)(p?12;p11)dup(2)(25.3p12)[2]/ 45,X,-Y,i(8)(q10),del(9)(p24.1p21.1),del(11)(q22.3q24.3),del(14)(q11.2q22.3),dup(15)(q26.2q26.3),der(18)t(2;18)(p?12;p11)dup(2)(25.3p12)[6]/ 46,XX[2]
M/21	64	ne	UNM	del(11q),+12,del(13q)	47,XY,del(11)(q14.1q23.3),+12[9]/ 47,XY,del(11)(q14.1q23.3),der(13)del(13)(q14.11)del(13)(q14.2q14.3),+12[3]/ 46,XY[1]
M/22	60	ano	UNM	del(11q),del(17p)	44,XY,der(4)del(4)(p16.3p15.1)t(15;10;9;4)(q22.3;q?11;?;p?14),-8,del(11)(q21q24.2),-15, t(17;20)(q21.31q23.1;?p)del(17)(p13.3p11.2)del(20)(p13p12.2)del(20)(p12.1)dup(20)(p12.2p12.1)dup(20)(p11.23p11.22)[7]/ 44,XY,idem,der(21)t(8;21)(?;?p)[5]/ 46,XY[3]
M/23	52	ne	MU	del(13q)*	46,XY,der(6)t(6;15)(p?24;q?26)del(6)(p25.1p24.3),der(13)del(13)(q14.3q14.3)ins(13;15)(q?14;q?25q?26)del(15)(q24.3q25.1)del(15)q26.1[90]
M/24†	59	ano	UNM	dup(8q),del(13q), del(17p)	44,XY,der(X)t(X;8)(?;q24),der(6)t(6;7)(p?24;q?21)ins(6;Y)(p?24;q?11),-7,dic(17;18)(p?11.2;p?11.2),der(20)t(7;20)(?;q?23)[8]/ 43,XY,der(X)t(X;8)(?;q24),der(6)t(6;7)(p?24;q?21)ins(6;Y)(p?24;q?11),-7,?dic(15;22)(p?11.2;p?11.2),dic(17;18)(p?11.2;p?11.2), der(20)t(7;20)(?;q?23)[2]
M/25†	49	ano	UNM	del(13q),del(17p)	44,XY,+i(2)(p10),der(3)t(3;8)(?p;q?23),-8,del(13)(q14),?dic(13;17)(p11.2;p11.2)del(13)(q14),?dic(18;19)(?p11.2;?q11.2)[15]/ 46,XY[5]

Pacient č.	Věk v době diagnózy	Mutace TP53	Mutační stav IGHV	Výsledek iFISH (panel CLL)	Závěrečný karyotyp
M/26†	57	ano	MU (VH3-21)	del(11q),del(13q)	46,XY,del(11)(q14.3q23.3),der(22)t(2;22)(p?p13)dup(2)(p25.34p11.2)[6]/ 46,XY,der(8)t(2;8)(p?p?)dup(2)(p25.34p11.2),del(11)(q14.3q23.3)[2]/ 46,XY[5]
M/27†	77	ano	MU	del(13q),del(17p)	44-45,XY,r(12)(p13q24.3),del(13)(q14.2),del(17)(p13.3p11.2),inc[cp3]/ 46,XY[4]
M/28†	61	ano	MU	dup(8q),del(13q), del(17p)	del(2p),dup(8q),del(13q),del(17p) ▪
M/29	68	nd	UNM	del(13q),del(17p)	44-45,XY,?-9,-12,-13,-17,-22,+3-4mar[cp7]/ 46,XY,-12,-13,-17,-22,+4mar[cp3]/ 46,XY[2]
M30†	68	ne	UNM	del(6q),del(11q)	46,XY,del(6)(q14.1q27),t(11;13)(q?23;q?22)del(11)(q22.1q23.3)[24]
Ž/31	72	nd	UNM	del(11q),del(13q), del(17p)	43,XX,-3,-4,-5,der(6)t(3;6)(q?25;q?27),del(9)(q?21),del(11)(q?21),del(14)(q?24),- 15,der(17)t(4;17)(?q?22;p?11)ins(17;5)(p?11;?q?21)del(17)(p?11), +der(?)(4p?16>4p?14::?:5?p?13>5?p?15::3?p?25>3?p?21::15q?15>5q?26)[14]/ 43,X,-X,der(2)t(2;9)(p?25;?q?32),del(6)(q?21),t(9;11;17)(p?22;q?21;q?25)del(17)(p?11),-9,-13,del(14)(q?24), der(15)t(3;15)(?q?21;p?11)ins(3;15)(?q?25;q?21)[3]/ 46,XX[1]
Ž/32†	65	nd	UNM	del(11q),del(13q)	44,XX,-8,der(11)del(11)(p15.5)del(11)(p15.4)del(11)(p14.3p12)del(11)(q14.1q25),-13,der(13)t(2;13)(p?12;p?12)dup(2)(p25.3p14), der(17)del(17)(p13.3p13.2)t(X;17)(p?11;p?13)dup(X)(22.33p11.3),der(18)t(8;18)(q?11;p?11)[28]/ 46,XX[2]
M/33	51	ne	MU	del(13q)*,t(14q)	46,XX,t(14;18)(q32;q21)[3]/ 46,XX,t(12;17)(q?21;q?23),t(14;18)(q32;q21)[6]/ 46,XX,t(6;13)(p?12;q?14)del(13)(q14.13q14.3),t(14;18)(q32;q21)[3]/ 46,XX,der(3)t(3;11)(q?;q?),t(12;13)(q?15;q?14)del(13)(q14.13q14.3),der(14)t(14;18)(q32;q21)t(8;1;14)(q?22;q?31;q?24)[3]
Ž/34	63	ne	nd	del(13q),+12	47,XX,+12,der(16)t(13;16)(q?13;p?13)del(13)(q?14)[6]/ 47,XX,t(2;14)(q?21;q?22),+12[2]/ 46,XX[13]
M/35	67	ne	MU (VH3-21)	del(11q),del(13q)	46,XY,dic(2;18)(q?11.2;p?11.2),+2,der(11)del(11)(q14.1q21)del(11)(q22.2q23.3),del(13)(q14.13q21.32)[20]/ 46,XY[10]
Ž/36	67	ne	UNM	del(11q)	46,XX,del(11)(q13.5q23.3),del(17)(q25.1q25.3),der(20)t(2;20)(p14;q?33)dup(2)(p25.3p14)[12]/ 46,XX[8]
Ž/37†	74	nd	nd	del(11q),del(13q), dup(13q)	del(11q),del(13)(q14),dup(13)(q34) ▪

Pacient č.	Věk v době diagnózy	Mutace TP53	Mutační stav IGHV	Výsledek iFISH (panel CLL)	Závěrečný karyotyp
M/38†	58	ano	UNM	del(17p)	45,XY,der(2)dup(2)(p13)ins(2;13)(p?;?q),der(11)t(11;17)(q?24;?p),der(13)t(2;13)(p?;q?13),?dic(17;22)(p11.2;p11.2)[5]/ 45,X,der(Y)t(Y;15)(q?11;q?21)der(2)dup(2)(p13)ins(2;13)(p?;q?),der(11)t(11;17)(q?24;?p),der(13)t(2;13)(p?;q?13),?dic(17;22)(p11.2;p11.2)[11]
M/39†	57	nd	UNM	del(11q),del(13q)	dup(2p),del(11q),del(13q) *
M/40	64	ano	MU	del(17p)	45,XY,dic(2;10)(p?23;q?26),t(7;8)(q?31;q?21),i(17)(q10)[3]/ 46,XY[11]
M/41	56	ne	UNM	del(13q)	46,XY,+2,dic(2;18)(q?11.2;p?11.2),t(2;13)(q?33;q?14)del(13)(q14.2q14.3)[12]/ 46,XY,der(20)t(13;20)(q?14;p?12)del(20)(20p13p12.3)del(20)(p12.3)del(13)(q14.2q14.3)[6]/ 46,XY,t(2;13)(q?33;q?14)del(13)(q14.2q14.3)[3]
M/42	60	ne	UNM	del(13q)	46,XY,der(1)del(1)(q24.3q25.1)del(1)(q25.1q25.1)del(1)(q25.3q31.1)del(1)(q31.2q31.3)del(1)(q42.12)del(1)(q42.2q42.3),ins(2;13)(q?32;q?) del(13)(q14.2q14.3)[23]/ 46,XY,idem,der(18)t(2;18)(?;p?12)[3]/ 46,XY,idem,t(2;14)(q?36;q?31)[2]/ 46,XY,idem,der(13)t(2;13)(q?;p?12)[2]/
Ž/43	64	ano	UNM	del(6q),del(17p)	45,XX,inv(3)(p?11.2q?26),dic(13;17)(p?11.2;p?11.2)ins(13;15)(q?14;?) [19]/ 45,XX,idem,der(9)t(9;18)(q?21;q?21)[9]/ 45,XX,idem,del(6)(q21q25.1),del(9)(q21.11q34.3)[3]/ 45,XX,idem,del(9)(q21.11q34.3),del(18)(p11.32p11.21)[3]/ 45,XX,idem,del(9)(q21.11q34.3),-18[2]/ 45,XX,idem,t(1;9)(q?23;q?21)ins(9;18)(q?21;?) [2]/ 46,XX[2]
M/44	78	ne	UNM	del(11q),del(13q)*	46,XY,del(11)(q14.3q25),del(13)(q14.2q14.3),t(13;14)(q?12;q?)del(13)(q14.2q22.2)[10]/ 46,XY[8]
M/45†	56	ne	UNM	del(6q),dup(11), del(13q)	46,XY,der(4)del(4)(q34.1qter)t(4;11)(q?33;q22)dup(11)(q23.2qter),del(6)(q14qter),del(13)(q14.2)[16]/ 46,XY[4]
Ž/46†	63	nd	MU	del(13q),del(14q), del(17p)	85-86<4n>,XXXX,-2,-4,-4,+6,-7,-8,-8,-12,-13,-15,-15,-17,+3-4mar[cp8]/ 46,XX[5]
Ž/47†	64	nd	UNM	del(13q),+12,del(14q)	47,XX,+12,del(14)(q24.1q32.33)[5]/ 47,XX,+12,del(13)(q?14),del(14)(q24.1q32.33)[2]/ 46,XX[7]
M/48†	67	ano	UNM	del(17p)	45,XY,der(2;13)(q?34;?p?13),i(17)(q10),-15,+mar,inc[20]/ 46,XY[2]
M/49†	71	ano	UNM	del(13q),del(17p)	45,XY,-8,del(13)(q14.2q14.3),der(17)del(17)(p13.3p13.1)t(8;17)(q?11;p?12)dup(17)(p13.1p12)[8]/ 46,XY[2]

Pacient č.	Věk v době diagnózy	Mutace TP53	Mutační stav IGHV	Výsledek iFISH (panel CLL)	Závěrečný karyotyp
M/50	56	nd	UNM	žádné aberace	46,XY,der(1)t(11;9;1)(p?12;q?22;?q42)dup(1)(q21.2q42.12)del(1)(q42.12qter)del(9)(q22.13q34.1)dup(11)(p12pter)[8]/46,XY[2]
Ž/51†	83	ano	nd	del(11q),del(13q)*	43-44,XX,der(2),der(5),del(11)(q22.1q23.3),del(13)(q14.11q21.33)[12]/46,XX[3]
M/52	64	ne	UNM	del(11q),+12	47,XY,der(3)del(3)(p24.3pter)t(8;4;3)(q?12;q?22;p?24)del(8)(q12.1q12.3),del(11)(q22.1q22.3),+12[12]/46,XY[3]
M/53	57	ne	UNM	dup(8q),del(11q),del(13q)	46,XY,der(11)del(11)(q22.3q23.3)dup(11)(q23.3)del(11)(q25)t(2;11)(p?12;q?13)dup(2)(p25.p12),der(11)del(11)(p15.1p14.3)t(8;11)(q?21;p?14)dup(8)(q13.3q24.3),der(13)del(13)(q14.11)del(13)(q14.2q14.3),der(18)del(18)(p11.31p11.23)del(18)(q22.3q23)[15]
Ž/54†	71	ne	UNM	del(11q)	46,XX,der(11)del(11)(q?)t(11;20)(q?;?),der(16)t(16;19)(?;p?),del(19)(p?),der(20)t(17;20)(?q;?) [20]/46,XY[2]
M/55†	61	ne	UNM	dup(8q),del(11q)	45,XY,der(5)t(5;8)(p?13;q?21),-8,del(11)(q13.5q23.2),der(17)del(17)(p13.3p11.2)t(8;17)(q?22;q?21)dup(8)(q21.3q24.3)[8]/46,XY[3]
M/56	64	ano	UNM	del(13q)	46,XY,+2,dic(2;20)(q?11.2;p?11.2),del(13)(q14.13q14.3)[15]/46,XY[5]
M/57†	65	ano	UNM	del(13q),del(17p)	46,XY,dic(2;18)(q?11.2;p?11.2),del(13)(q?14),del(17)(p?11p?13)[10]/45,XY,dic(2;18)(q?11.2;p?11.2),del(13)(q?14),-17[5]/46,XY[5]
Ž/58	59	ano	UNM	del(6q),dup(8q),del(11q),del(13q)*,del(17p)	46,XX,del(6)(q?11q?ter),der(17)del(17)(p?11)t(6;17)(p?12;p?11)[3]/45,XX,-6,der(17)del(17)(p?11)t(6;17)(p?12;p?11)[5]/46,XX,del(13)(q14.11q?14.3)[7]/45,XX,dic(17;22)(q?11;p?11)[7]/46,XX,del(11)(q13.5q23.3),del(13)(q14.11q?14.3)[4]/46,XX,der(11)del(11)(q13.5q23.3)t(8;11)(q?22;q?25)dup(8)(q22.3q24.3)[4]/46,XX[5]
M/59†	63	nd	MU	dup(8q),del(13q)	46,XY,der(3)del(3)(p26.3p25.3)t(3;8)(p?25;q?22)dup(8)(q22.1q24.3),der(8)del(8)(p23.3p12)t(3;8)(p?25;q?22)dup(3)(q25.31q29),del(13)(q14.2q14.3)[8]/46,XY[7]
M/60†	71	nd	UNM	del(6q),del(11q),del(13q)	46,XY,t(5;11)(p14;q24)del(11)(q?22),del(6)(q?21),del(13)(q?14)[8]/46,XY[3]
M/61†	73	ne	MU (VH3-21)	del(11q),del(13q)*	46,XY,del(11)(q14.1q23.1),del(13)(q14.2q14.3)[23]/46,XY,t(9;13)(p22;q12)?inv(9)(p?22;q?22)del(13)(q14.2q14.3),del(11)(q14.1q23.1),del(13)(q14.2q14.3)[5]/46,XY[2]

Pacient č.	Věk v době diagnózy	Mutace TP53	Mutační stav IGHV	Výsledek iFISH (panel CLL)	Závěrečný karyotyp
M/62	39	ne	UNM	del(13q)	46,XY,t(13;14;15;17)(q?13;q?24;q?21;q?21)ins(14;6)(q?24;p?21)del(13)(q14.13q14.3)[9]/ 46,XY,der(18)t(2;18)(p?12;p?11)dup(2)(p?12)[3]/ 46,XY[32]
M/63	60	ano	UNM	del(13q),del(17p)	46,XY,t(12;17)(q?13;p?13)del(12)(q13.12q13.13)del(17)(p13.2p13.1),del(13)(q?14),der(21)t(2;21)(p?21;p?12)dup(2)(p25.3p21)[8]/ 46,XY[41]
Ž/64	64	ne	MU	del(13q)*	46,XX,del(13)(q14.2q14.3),del(13)(q14.2q14.3)[15]/ 46,XX,der(7)t(2;7)(p?13;q?36)dup(2)(p?11.2p?25),del(13)(q14.2q14.3),del(13)(q14.2q14.3)[3]/ 46,XX[2]
M/65	75	ne	UNM	dup(8q)	46,XY,t(8;18)(q24;q?23)dup(8)(q?24)[13]/ 46,XY,der(4)(4pter>4q?13::7q31>7q?::4q?21>4q?35::6p?13>6p?21::6q?25>6qter),der(6)(4qter>q?35::6p?13>q?25::6p?21>6pter)[7]/ 46,XY[5]
Ž/66	69	ne	UNM	del(6q),dup(8q)	46,XX,del(6)(q16.1q26),del(13)(q14.11q21.31),del(13)(q14.2q14.3),der(19)t(8;19)(q?23;q13.3)dup(8)(q23.1q24.3)[14]/ 46,XX[3]
M/67	58	ne	UNM	del(13q)	46,XY,der(3)t(3;17)(q?29;q?),del(13)(q14),der(17)t(13;17)(q?;q?)ins(17;20)(q?;?)[16]/ 46,XY[4]
M/68†	70	ano	MU	del(13q),del(17p)	del(7q),del(13q),del(17p) *
M/69†	67	ne	UNM	dup(8q),del(11q)	43,XY,trc(3;18;21)(18qter>18q?12::3q?28>3p11::18q?12>18p11::21p11>21qter),dic(8;13)(p11;p11),der(11)del(11)(q22.3)t(11;14)(q?21;q?11)[20]
M/70†	60	ne	UNM	dup(8q),del(11q)	45,XY,der(8)(q24.21),del(11)(q?22),-15,der(17)t(15;17)(q?15;?)[15]/ 46,XY[5]
M/71	75	ne	UNM	del(6q),dup(8q), del(13q)*	del(6q),dup(8q),del(13q)*•
Ž/72†	66	ano	UNM	dup(2p),del(11q), del(13q)*	44,X,-X,t(2;3)(?q22;?p21),der(4)t(4;13)(?q35;?p11)del(13)(q12.13q21.31),dic(9;11)(q?21;p?11.2),del(13)(q12.13q21.31)[4]/ 43,X,-X,?dic(2;3)(q?11.2;q)t(2;3)(?q;?q)t(2;8)(?p;?q),der(4)t(4;13)(?q35;?p11)del(13)(q12.13q21.31), der(8)t(3;8)(?q;?q)ins(8;2)(?q;?q),dic(9;11)(q?21;p?11.2),del(13)(q12.13q21.31)[3]
M/73	65	ne	UNM	dup(8q),del(11q), del(13q)	46,XX,der(6)(p25.3p23),dup(8)(q22.1q24.3),del(11)(q22.3q25),der(13)del(13)(q14.11)del(13)(q14.11q21.1)[12]/ 46,XY[8]
Ž/74	59	ano	UNM	del(6q),dup(8q), del(17p)	45,XX,der(6)del(6)(q14.1q25.1)t(6;16)(q?25;q?21),der(10)t(10;17)(p?14;q?21)del(17)(p13.3p11.2),der(14)t(8;14)(q?21;q?32)dup(8)(q21.13q23.3) , -16[21]/ 44,XX,der(5)t(5;8)(q?35;q?21)dup(8)(q21.13q23.3),der(6)del(6)(q14.1q25.1)t(6;16)(q?25;q?21),der(10)t(10;17)(p?14;q?21)del(17)(p13.3p11.2), der(15)t(15;18)(p?11;q?11),-16,-18,der(22)t(8;22)(q?21;p?12)dup(8)(q21.13q23.3)[6]
M/75	48	ne	MU	+12,del(13q)*	del(5q),+12,del(13q)*•
M/76	58	ne	UNM	del(11q),del(13q)*, del(17p)	del(11q),del(17p),del(13q)*•

Pacient č.	Věk v době diagnózy	Mutace TP53	Mutační stav IGHV	Výsledek iFISH (panel CLL)	Závěrečný karyotyp
M/77†	87	ano	UNM	del(6q),del(17p)	45,XY,der(3)del(3)(p26.3p12.3)t(3;15)(p?12;q?11)del(15)(q11.2q13.1)del(15)(q14q15.3),del(6)(q21),-15,del(17)(p13.3p11.2)[14]/46,XY[6]
M/78	51	ne	UNM	del(11q),del(13q)*	46,XY,+idic(2)(p11.2),-8,del(11)(q13.5q24.2),del(13)(q14.11q14.3),der(21)t(8;13;21)(q?13;q?14;q?22)[7]/46,XY[3]
Ž/79†	67	ne	MU (VH3-21)	dup(11q),del(17p)	48,XX,der(1)dup(1)(q?),t(3;21)(q?27;q?),+3,der(12)t(11;12)(q?21;q?23)dup(11)(q?22),der(17)del(17)(p?13)t(16;17)(p?11;p?)del(16)(p?),+18[7]/49,X,-X,der(1)dup(1)(q?),t(3;21)(q?27;q?),+3,+3,+7,der(12)t(11;12)(q?21;q?23)dup(11)(q?22),der(17)del(17)(p?13)t(16;17)(p?11;p?)del(16)(p?),+18[12]/46,XX[1]

Legenda: panel CLL (ATM, TP53, 13q14, cep 12, 6q21, 8q24).

M (muž), Ž (žena), † (pacient zemřel), MU (mutovaný), UNM (nemutovaný), nd (nevyšetřeno), *(kombinace monoalelické a bialelické delece),

▪ založeno na iFISH (interfázní FISH; ≥70 % jednotlivých aberací nebo společný výskyt v jednom klonu prokázaný dodatečným vyšetřením FISH)

Tab. 3: Výsledky arrayCGH

Pacient č.	Věk v době diagnózy	ISCN zápis výsledku arrayCGH
M/1†	65	arr[GRCh37] (12)x3,13q14.2q14.3(48557360_51814353)x1,?13q21.32q31.3(68130362_91859415)x3,15q14q15.1(39572546_42367673)x1
M/2†	64	arr[GRCh37] 13q14.2q14.3(48941714_51637034)x1,8q22.2q24.3(100829780_146294098)x3
M/3†	34	arr[GRCh37] 2p25.3p21(17019_44533462)x3,2p16.3p15(48086274_63985228)x3,8q11.21q11.23(51210232_54306826)x2 hmz,11q14.1q25(79992712_134934196)x1,13q14.11q14.3(41264453_54490011)x1
M/4	44	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_67294799)x3,3p26.3p25.3(62199_11712047)x1,3q21.2q29(124267110_197837049)x3,(12)x3,15q26.1q26.3(93143013_102399819)x1
M/5†	73	arr[GRCh37] 3p26p21.31(212817_50018329)x1,7p22p15.1(94136_28636921)x1,9q22.33q34.3(101849491_140997194)x1,14q24.1q32.33(69340601_104313141)x1,17p13.1(7495272_7741642)x1,18q21.2(53348598_56877019)x1,18q21.2q21.32(57912614_69890646)x3
M/6	65	arr[GRCh37] 11q22.3(103461090_108886109)x1,(12)x3,13q21.2q21.32(61823181_65943137)x3,18q23(73359922_77875127)x3,19q13.12q13.2(38161572_42940785)x3
M/7	52	nd
M/8	43	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3
Ž/9†	71	arr[GRCh37] (1-22,X)x2
M/10†	82	arr[GRCh37] 6q14.3q25.1(87178844_152275781)x1,(8)x3,11q14.1q23.3(76924259_115950970)x1,13q14.13q14.3(46381681_52920261)x1
Ž/11†	58	arr[GRCh37] 1p22.3p22.2(85974030_90597198)x2 hmz,1q25.3q44(181233840_249197762)x1,4q26(115648592_118842308)x2 hmz,6p25.3(206749_307998)x4,6p25.3p25.2(462432_2794740)x1,6p25.2p24.3(2840191_8233339)x4,6p24.3p12.3(8255787_49461318)x1,6p24.1(12805213_12974652)x3,6p22.3(16410757_16819710)x3,6p21.1(43666168_43754101)x4,6p12.3p11.1(49656904_58774324)x4,6q23.3q27(137660467_170921089)x1,9q13q34.3(66151746_140999928)x4,10q23.2q24.32(88359279_104586249)x1,11p15.5p11.2(196966_44316985)x1,11q14.1q22.3(79674459_107692122)x1,12p13.33p12.3(192511_18592680)x1,12p11.22p11.1(28131139_34827047)x1,13q13.3q14.3(36667248_52461674)x1,15q21.3q26.3(57799648_102465355)x3,16q11.2q24.3(46467474_90148393)x1,17p13.3p11.2(13051_21433444)x1,17q22q25.3(57512844_81044553)x3,18p11.32p11.21(2840441_14158122)x1,18q21.2q23(51761148_78012829)x4,19p13.3(2438967_5106054)x1,22q13.1q13.33(38238643_51177360)x1
Ž/12†	61	arr[GRCh37] 2p25.p11.2(61060_90133447)x3,3q26.2q29(168063809_197674706)x3,6p21.31p12.3(34810649_48848091)x1,13q14.3(50368875_50546925)x0,18p11.32p11.21(179428_11054527)x1
Ž/13	56	arr[GRCh37] 8q21.13q23.1(84544461_108671148)x3,8q23.1q24.13(108815704_126511295)x1,8q24.21q24.3(127770332_146230967)x3,9q33.2q34.11(123835380_131704317)x1,11q14.1(79877962_82443066)x1,11q22.3q23.3(105103502_115743086)x1,17p13.3p11.2(29169_22154574)x1,18p11.32p11.21(148963_15072794)x1
Ž/14†	65	nd
M/15	60	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_88432864)x3,11q14.1q23.3(82749186_121316489)x1
M/16†	57	nd
M/17†	66	arr[GRCh37] 6p25.3p21.1(132043_42372170)x2~3,6q23.3q27(136959359_171005496)x1~2,8p23.3p11.1(61774_43529733)x1,8q21.22q24.3(79438326_146280020)x3,9p24.3p21.1(79158_28082725)x1,11q14.3q23.3(90022515_121061508)x1,13q14.2q14.3(50470122_51971784)x1,(15)x1,18q21.2q21.31(52387092_53887416)x1,19p13.3p12(259395_20382674)x1

Pacient č.	Věk v době diagnózy	ISCN zápis výsledku arrayCGH
Ž/18	73	arr[GRCh37] Xp11.23p11.21(47840399_57999932)x2 hmz,Xq11.1q13.1(62850896_68761102)x2 hmz,Xq28(147864249_155158531)x2 hmz,1q21.3(151379687_152031445)x1,1q23.1q23.3(158684003_161748409)x1,1q25.3q31.1(185315816_186415916)x1,1q31.2q31.3(193104226_195426190)x1,1q31.3(195932301_196471448)x1,1q32.2q32.3(208470193_212761063)x1,1q42.12q42.13(225707290_228729428)x1,1q42.2q42.3(234073110_235577846)x1,6q13q22.31(71601629_121899646)x1,?8q21.12(78872330_79056502)x1,8q24.12q24.13(120459991_122805832)x1
M/19†	70	arr[GRCh37] 2p25.3p12(235263_77340292)x3,11q14.1q23.2(78965050_115751183)x1,13q13.1(32231813_33944539)x1
M/20†	56	arr[GRCh37] (Y)x0,2p25.3p12(17019_79180898)x3,8p23.3p11.1(191530_43541986)x1,8q11.1q13.2(47229005_68343898)x1,8q13.2(68832961_70498318)x1~2,8q13.3(71238938_73440693)x1~2,8q13.3q24.3(73635634_146121090)x3,9p24.1p21.1(8352705_30767166)x1,11q22.3q24.3(102936356_127970238)x1,14q11.2q22.3(24328784_56729135)x1,15q26.2q26.3(95368273_99010585)x3,18p11.32p11.21(148963_15072794)x1
M/21	64	arr[GRCh37] 11q14.1q23.3(80965983_115743086)x1,(12)x3,13q14.11(40124661_41981572)x1,13q14.2q14.3(48557360_52439022)x1
M/22	60	arr[GRCh37] 4p16.3p15.1(41400_35117991)x1,11q21q24.2(95086389_125625763)x1,15q14q22.31(31652957_62007310)x1,17p13.3p11.2(66136_18177382)x1,17q21.31q23.1(41610162_55575105)x3,20p13q12.2(1670013_11145496)x1,20p12.2p12.1(11841700_12243624)x3,20p12.1(14747128_17504577)x1,20p11.23p11.22(19335135_21715861)x3
M/23	52	arr[GRCh37] 6p25.1p24.3(5616078_8296158)x1,13q14.2q14.3(48740515_51841299)x1,15q24.3q25.1(78007277_78637448)x1,15q26.1(90893631_91836385)x1
M/24†	59	nd
M/25†	49	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92262019)x3,3p26.3p21.31(117735_49926729)x1,3p14.1p12.3(68927704_75279055)x1,3p12.2p12.1(81523854_85098226)x1,3p12.1p11.1(85896326_90400870)x3,8p23.3p23.1(191530_8221982)x1,8p23.1p22(12404003_17984875)x1,8p12p11.21(29000703_40886605)x1,8q11.1q11.21(46924418_50207451)x1,10q24.2q25.2(99895278_112105252)x1,13q13.3(36698309_38460730)x1,13q14.2q21.32(49122864_66982944)x1,17p13.3p11.2(84287_22003066)x1,18p11.32p11.21(184254_14103971)x1,?19p12(20216230_24376837)x3,?19q13.42q13.43(56167796_59063507)x1
M/26†	57	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_84801042)x3,8q11.21q11.23(50265769_54910006)x2 hmz,11q14.3q23.3(89346772_116149746)x1
M/27†	77	arr[GRCh37] 13q14.2(50368875_50952073)x1,17p13.3p11.2(2990938_17304683)x1
M/28†	61	arr[GRCh37] Xp22.33(60701_2685674)x0,Xq21.31(88512785_90085154)x0,(Y)x0,2p25.3p21(30341_47715127)x1,2p16.1p14(60932053_64790014)x3,2p14p13.3(66842948_69936266)x1,2p12(76891511_78537044)x1,2q11.1q13(95529039_113291495)x1,2q13q14.2(113331042_120099217)x3,2q14.2(120123060_120405084)x1,2q21.3(135837264_136147960)x1,6p22.3p21.1(15250020_43069406)x1,8q21.11q24.3(76258615_146280020)x3,13q14.13q14.3(45966109_52064658)x1,17p13.3p11.2(24457_18899368)x1,17p11.2(19143173_20675339)x3,17p11.2p11.1(21336799_22225638)x1
M/29	68	arr[GRCh37] 12p13.33(369140_1826058)x1,12p13.32(4865832_5184697)x3~4,12p13.31(7029407_7558868)x1,12p13.31(9637323_9693948)x0,12p13.31(9735469_9779154)x3,12p13.31p12.2(9819968_20610831)x1,12p12.2p12.1(20635952_23123827)x3,12p12.1(23147358_25944355)x1,12p11.23p11.1(28018178_34063934)x1,13q14.2q22.2(48125673_75498285)x1,17p13.3p11.2(44684_22183006)x1,17q21.2q21.31(40259418_42599870)x1
M30†	68	arr[GRCh37]6q14.1q27(80400218_166065639)x1,11q22.1q23.3(100196082_114387117)x1
Ž/31	72	arr[GRCh37] 3p26.3p21.31(62199_49745159)x1,3p14.1p13(57394988_70391876)x1,3p13q12.2(71685677_100360751)x1,3q13.31q21.1(115069433_123584190)x1,3q22.1q22.2(130403586_135458567)x1,3q25.31q28(156266931_188858290)x3,4p14q22.3(40267180_96887095)x1,4q34.3q35.1(180614795_183807072)x1,5q11.1q21.3(49478288_106701371)x1,6q21q23.3(111901323_136318125)x3,9p22.1p21.1(19521081_28063806)x1,9q33.2q34.3(123426252_140622821)x1,11q21q23.3(95915588_117055331)x1,14q24.1q32.33(69260718_106923660)x1,15q11.2q15.2(22698522_43427709)x1,17p13.3p11.2(20132_20923442)x1,17q24.3q25.3(68379640_81044553)x3

Pacient č.	Věk v době diagnózy	ISCN zápis výsledku arrayCGH
Ž/32†	65	arr[GRCh37] Xp22.33p11.3(60701_44036619)x3,2p25.3p14(17019_68100221)x3,8p23.3q11.22(61774_52320614)x1,8q12.1q13.2(60733056_69978446)x1,11p15.5(196966_1996800)x1,11p15.4(3645310_5574014)x1,11p14.3p12(24616945_39271543)x1,11q14.1q25(82413892_134934196)x1,13q11q12.12(19024748_25301612)x1,13q13.2q34(34263793_115092648)x1,17p13.3p13.2(1693_5935643)x1
M/33	51	arr[GRCh37] 8q21.12q21.13(78665561_82521070)x2 hmz,13q14.13q14.3(46706237_51841299)x1
Ž/34	63	arr[GRCh37] (1-22,X)x2
M/35	67	arr[GRCh37] 2p16.3p16.2(50792617_53685611)x3,2p12p11.2(76316196_83844907)x3,11q14.1q21(77386791_92950877)x1,11q22.2q23.3(102147226_116093284)x1,13q14.13q21.32(47091739_68059049)x1
Ž/36	67	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_65551510)x3,11q13.5q23.3(75870291_117965282)x1,17q25.1q25.3(74404855_75413830)x1
Ž/37†	74	nd
M/38†	58	nd
M/39†	57	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(61060_90133447)x3,11q14.1q23.3(83344386_118714084)x1,13q14.2(50368875_50546925)x1,17q22q23.2(50511537_60118579)x3,17q25.1q25.3(72366509_80215871)x3
M/40	64	arr[GRCh37] 1q21.3q44(152453240_249166593)x2 hmz,2p21(43142825_44637779)x3,2p21p16.3(45739484_50823100)x3,2p16.1p14(57692648_66033455)x3,2p13.1p12(74099992_75729253)x1,2p12(78970764_79706557)x1,2q14.2q14.3(121334064_126722063)x1,2q32.1q33.1(187922705_200676541)x3,2q33.3q35(207210462_216748567)x3,2q37.1q37.3(234832485_239093573)x3,8q22.2q22.3(100990011_101970085)x3,11q13.1(64775062_65727456)x3,17p13.3p11.2(48539_22183006)x1,17q11.1q25.3(25343175_81044553)x3,17q11.1q12(25468600_32739642)x3 hmz,17q22q24.2(57455620_64387069)x3 hmz
M/41	56	arr[GRCh37] 13q14.2q14.3(47374693_52138508)x1,20p13p12.3(4709272_5224997)x1,20p12.3(7103757_7508659)x1
M/42	60	arr[GRCh37] 1q24.3q25.1(171632442_174553313)x1,1q25.1q25.1(174577841_175817246)x1,1q25.3q31.1(184363119_186549823)x1,1q31.2q31.3(193460554_194618428)x1,1q42.12(225394432_226141756)x1,1q42.2q42.3(232329944_235476995)x1,13q14.2q14.3(48601120_51541846)x1
Ž/43	64	arr[GRCh37] Xp22.2p22.11(16912703_23128647)x2 hm,2q11.2q12.3(101161798_108812123)x2 hmz,9q21.11q34.3(70984481_141018984)x1,15q15.1q15.2(40373869_43482026)x1,15q22.2(59610602_60573879)x1,15q22.31(63799795_65514304)x1,15q25.2(83229665_83619766)x1,17p13.3p11.2(36617_19143232)x1,18p11.32p11.21(155478_11693469)x1,18q11.2q21.2(23537187_49485890)x2
M/44	78	arr[GRCh37] 11q14.3q25(89837484_131822094)x1,13q13.1q14.2(32797551_50470181)x1,13q14.2q14.3(50500134_51625488)x0,13q14.3q22.2(51672708_76184863)x1
M/45†	56	arr[GRCh37] 4q34.1qter(176616536_191121344)x1,6q14qter(80772303_1707734227)x1,11q23.2qter(116439392_133951370)x3,13q14.2(49473507_51932389)x1
Ž/46†	63	nd
Ž/47†	64	arr[GRCh37] (12)x3,14q24.1q32.33(68750616_106009354)x1
M/48†	67	nd
M/49†	71	arr[GRCh37] 8p12q11.21(32314965_51543228)x1,13q14.2q14.3(46851293_53630550)x1,17p13.3p13.1(44684_8524604)x1,17p13.1p12(8595039_13677421)x3
M/50	56	arr[GRCh37] 1q21.1q41(142617943_223016450)x3,1q41q44(223038710_249212668)x1,9q21.11q22.33(70901814_99448446)x3,9q22.33q34.12(99640198_133614751)x1,9q34.12q34.3(133680765_141012423)x3,11p15.5p13(196966_35563192)x3
Ž/51†	83	arr[GRCh37] 2p13.3p11.1(70424665_91794601)x1,5q12.1q15(62130429_97151705)x1,11q22.1q23.3(97671578_116497405)x1,13q14.11q21.33(41373641_70455479)x1

Pacient č.	Věk v době diagnózy	ISCN zápis výsledku arrayCGH
M/52	64	arr[GRCh37] 3p24.3pter(17097664_224727)x1,8q12.1q12.3(59223394_666677367)x1,11q22.1q22.3(100505885_155832136)x1,(12)x3
M/53	57	arr[GRCh37] 2p25.p12(10702_83248070)x3,8q13.3q24.3(72972750_146293435)x3,11p15.1p14.3(17782804_23983072)x1,11q22.3q23.3(107391362_116629101)x1,11q23.3q23.3(116672303_120308128)x3,11q25q25(133305633_134934196)x1,12p13.32p13.31(4260747_7853479)x2 hmz,13q14.11q14.11(42218165_42660542)x1,13q14.2q14.3(49581965_51672767)x1,18p11.31p11.23(4390986_7112200)x1,18q22.3q23(70130064_78010032)x1
Ž/54†	71	nd
M/55†	61	arr[GRCh37] 8p23.3p11.1(191530_43613304)x1,8q11.1q11.21(47123709_50539940)x1,8q21.3q24.3(91909986_146230967)x3,11q13.5q23.2(77035710_114352609)x1,17p13.3p13.2(29169_6256034),17p12p11.2(11057405-19757817)x1
M/56	64	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_922632019)x3,13q14.13q14.3(47091739_51229962)x1,20p13p11.1(607407_26312663)x1,?18q12.1q12.3(24807314_41068920)x3
M/57†	65	nd
Ž/58	59	arr[GRCh37] 6p21.1q27(41193309_171005496)x1,8q22.3q24.3(104813948_146280020)x3,11q13.5q23.3(75415121_117221727)x1,13q14.11q14.2(41912104_50500193)x1,13q14.2q14.3(50516570_51462302)x0,17p13.3p11.2(995913_21094771)x1,17q11.2(27217713_29667527)x1,?18q22.1(62786494_65934581)x3,?20q11.21q13.33(29948315_62949149)x1
M/59†	63	arr[GRCh37] 3p26.3p25.3(62199_10742366)x1,3q25.31q29(155406126_197861598)x3,8p23.3p12(119720_33791636)x1,8q22.1q24.3(94543197_146128791)x3,13q14.2q14.3(50516570_51764796)x1,17p12(12495048_13549498)x3
M/60†	71	nd
M/61†	73	nd
M/62	39	arr[GRCh37] 13q14.13q14.3(46908948_51581347)x1
M/63	60	arr[GRCh37] 2p25.3p21(23938_45171162)x3,2p12(76316196_83090093)x3,17p13.2p13.1(4633908_7578257)x1,?17q11.2(27245882_29667527)x1,17q25.1(72976958_73713052)x1
Ž/64	64	arr[GRCh37] 11q14.3q25(90738575_134772654)x2 hmz,13q12.11q34(20286064_115064542)x2 hmz,13q14.2q14.3(48879210_51322014)x0
M/65	75	arr[GRCh37] (1-22)x2,(X,Y)x1
Ž/66	69	arr[GRCh37] 6q16.1q26(97422368_164387954)x1,8q23.1q24.3(107025536_146230967)x3,13q14.11q21.31(45196648_63390155)x1,13q14.2q14.3(48879210_51394051)x0
M/67	58	arr[GRCh37]3q29q29(193979121_195915168)x1,5q13.2q13.2(68791272_70636824)x1,10q11.22q11.22(46699464_49262406)x1,13q14.13q14.3(46833667_51814353)x1,17q21.31q21.33(43706886_47730031)x1,20q11.23q11.23(34641351_35813504)x1,20q13.13q13.13(47715319_49578560)x1
M/68†	70	arr[GRCh37] 7q31.1q34(107641872_141079377)x1,13q14.2q14.3(48015276_51573841)x1,17p13.3p11.2(622586_20289789)x1,18q21.31q23(54518395_77875127)x3
M/69†	67	arr[GRCh37] 3p26.3p25.3(62199_9263553)x1,3p24.3p22.2(20950951_37826203)x1,3p21.31(45339591_48041998)x1,3p13p12.2(72350409_82248644)x1,3q11.1q12.1(93538467_98574494)x1,3q13.2(111500694_112152659)x1,3q23q24(142779378_146177964)x1,6p24.3p24.2(8927157_10746647)x1,6p22.2p22.1(25790377_27449456)x1,8p23.3p11.23(191530_37024831)x1,11q22.3(106622103_108805577)x1,18p11.32p11.22(64847_9095679)x1,18p11.21(13049521_15072794)x1,18q11.2q12.3(21019954_39966950)x1
M/70†	60	arr[GRCh37] 8q24.21(127495432_130681202)x3,15q11.2q15.1(25185927_41157098)x1
M/71	75	arr[GRCh37] 6q21(105958229_109401651)x1,13q13.1q14.3(32478658_52646227)x1,13q14.2q14.3(50572617_51462302)x0
Ž/72†	66	arr[GRCh37] (X)x1,9q21.13q34.2(74235750_136431359)x1,11q13.5q23.3(75547969_120395006)x1,13q12.13q21.31(25739332_61860451)x0

Pacient č.	Věk v době diagnózy	ISCN zápis výsledku arrayCGH
M/73	65	arr[GRCh37] 6p25.3p23(206749_14124227)x3,8q22.1q24.3(97371415_146280020)x3,10q22.1q23.31(72424312_89630424)x2 hmz, 11q22.3q25(105103502_134934196)x1,13q14.11(41431155_41808727)x1,13q14.11q21.1(42341412_57834135)x1,18q21.2q21.31(49201670_56105868)x2 hmz
Ž/74	59	arr[GRCh37] 2q33.1q36.1(198405960_223179791)x1,6q14.1q25.1(76840215_149848997)x1,8q21.13q23.3(81825880_114430348)x3,8q23.3(114459489_146280020)x4, 16p11.2p11.1(29592783_35177478)x1,16q11.2q21(46500741_65471663)x1,17p13.3p11.2(29169_18921097)x1
M/75	48	arr[GRCh37] 5q13.2q13.2(68975303_70636824)x1,(12)x3,13q13.3q13.3(36729959_37487612)x1,13q14.11q14.11(40061757_42604957)x1, 13q14.2q14.2(48367407_50323723)x1,13q14.2q14.3(50353487_51764796)x0,14q24.1q24.3(69638216_76477107)x1,(18)x3,(19)x3
M/76	58	arr[GRCh37] 4q21.21q21.23(78838805_84344173)x1,11q14.1q24.2(81341265_124290701)x1,13q14.2q14.3(50500134_51423054)x0,17p13.3p13.2(3515739_5560010)x1, 17p13.1p13.1(6255975_8053441)x1
M/77†	87	arr[GRCh37] 3p26.3p12.3(62199_77054662)x1,6q21(106029325_109752239)x1,8p23.1(7239491_8079920)x1,15q11.2q13.1(24833323_29482233)x1, 15q14q15.3(38105175_43637970)x1,17p13.3p11.2(141652_20649165)x1
M/78	51	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_89160192)x3,11q13.5q24.2(77014699_124810014)x1,13q14.11q14.3(41184150_53215470)x1,13q14.2q14.3(50544724_51501609)x0, 13q12.3q13.1(29049784_32893791)x2 hmz,13q13.1q13.3(33277086_36154966)x2 hmz,13q13.3(36783312_39948767)x2 hmz,13q21.31q21.33(64191061_69644972)x2 hmz, 13q21.33q31.1(70007016_80399492)x2 hmz,13q31.1q31.2(81434585_89241406)x2 hmz,13q31.2q31.3(89362784_94284016)x2 hmz,13q33.2q34(105928571_113581291)x2 hmz
Ž/79†	67	nd

Legenda: M (muž), Ž (žena), † (pacient zemřel), nd (nevyšetřeno)

4.1.3 Diskuze

Komplexní karyotyp jsme v našem souboru našli u 79 neléčených pacientů (12,3 %). Taktéž jsme prokázali i jeho negativní prognostický význam, což je v souladu s dosud publikovanými daty [46, 48, 51, 134, 135, 167, 171, 173, 212]. Do studie byli zařazeni i pacienti s neúspěšnou kultivací buněk pro cytogenetické vyšetření, u kterých byl výskyt minimálně tří aberací v jednom klonu prokázán pomocí FISH (prokazující kombinace FISH sond nebo současný výskyt 3 aberací ve více než 70 % interfázních jader). V rámci komplexního karyotypu bylo detekováno velké množství různých změn, nicméně nejčastějšími byly delece oblastí 13q14 (68 %), 11q22 (43 %), 17p13 (3 %), duplikace 2p (33 %), 8q24 (27 %) a delece 6q21 (14 %), což bylo také prokázáno v dřívějších publikacích [10, 127, 158, 164, 173, 213]. Nicméně na rozdíl od jiných autorů jsme neprokázali vliv jednotlivých typů změn (translokací, numerických změn ani dicentrických chromozomů) ani jejich počtu (3–4 nebo 5 a více změn v jednom klonu) v rámci komplexního karyotypu na celkové přežívání pacientů [176, 214]. V recentní multicentrické studii [176] byli pacienti s CK rozděleni do několika prognostických podskupin. Pacienti s trizomiemi chromozomů 12 a 19 byli zařazeni do skupiny s nejlepší prognózou, horší prognózu měli pacienti se 3, resp. 4 abnormalitami a nejhorší podskupinu tvořili pacienti s 5 a více cytogenetickými abnormalitami. Vzhledem k limitovanému počtu pacientů v naší skupině však nebylo možné tyto analýzy provést, do první podskupiny pacientů bychom mohli zařadit pouze jednoho pacienta. Také jsme zaznamenali vyšší incidenci *TP53* aberací u pacientů s více než 5 změnami v CK ve srovnání s pacienty se 3–4 změnami v CK (48 % vs. 27 % ve skupině se 3 nebo 4 změnami), nicméně vliv na OS prokázán nebyl. Autoři Baliakas a kol. vliv aberací genu *TP53* u pacientů s 5 a více změnami v CK (tzv. high-CK) také neprokázali [176]. Na rozdíl od jejich studie jsme neprokázali vliv vyššího počtu změn v CK na OS, což může být způsobeno výrazně nižším počtem pacientů a zároveň skutečností, že v naší studii byly kombinovány výsledky konvenční cytogenetiky i FISH a arrayCGH, byly-li k dispozici, a tyto další metody přinesly další informaci o závěrečném karyotypu. To mohlo ovlivnit závěrečný počet abnormalit v jednotlivých patologických klonech.

Dále nás zajímalo, zda celkové přežívání pacientů s CK ovlivňují vysoce rizikové abnormality, jakými jsou delece 11q a 17p, popř. mutace *TP53*. Pacienti a aberacemi genů *TP53* a *ATM*, ať už byly součástí CK či nikoliv, měli horší prognózu ve srovnání

s pacienty bez těchto abnormalit (bez CK). Pacienti bez CK s delecemi *TP53* nebo *ATM* měli celkové přežívání srovnatelné s přežíváním pacientů s CK ($p=0,37/p=0,75$). Avšak pacienti s CK a zároveň mutacemi/delecemi genu *TP53* měli horší OS ve srovnání s pacienty s mutacemi/delecemi genu *TP53* bez CK ($p=0,0084$). V rámci CK pak statisticky významný rozdíl v přežívání pacientů s/bez aberací *TP53* a/nebo *ATM*, navzdory jejich vyšší incidenci, prokázán nebyl, což je v souladu s výsledky studie Thompson a kol. [175]. Byl však patrný trend k horšímu přežívání u pacientů s CK a zároveň mutacemi/delecemi genu *TP53* ($p=0,076$).

Všeobecně je mezi pacienty s CLL vyšší zastoupení mužů než žen (v poměru téměř 2:1), mívají také kratší celkové přežívání [215]. V naší kohortě pacientů s CK bylo celkem 57 mužů a 22 žen (2,6:1). Celkem logicky bylo OS výrazně kratší u žen s CK v porovnání s ženami bez CK ($p<0,0001$), tento rozdíl byl však v porovnání s muži větší. Nicméně rozdíl v OS mezi muži a ženami v rámci CK (84 měsíců u mužů a 37 měsíců u žen) nebyl prokázán jako statisticky významný ($p=0,14$). Možným vysvětlením by mohlo být vyšší zastoupení aberací genu *TP53* (55 % u žen, 35 % u mužů). Vzhledem k limitujícímu počtu pacientů v naší práci by bylo zajímavé potvrdit tyto výsledky ve větších mezinárodních studiích, kde zatím porovnání OS mezi jednotlivými pohlavími provedeno nebylo.

Dalším všeobecně známým a uznávaným prognostickým faktorem je věk pacientů [216]. Medián věku při diagnóze pacientů v naší CK kohortě byl 64 let (s rozmezím 34–87 let), horší přežívání pak bylo prokázáno u pacientů starších 60 let ($p=0,0075$).

Bylo tedy prokázáno, že pro stratifikaci pacientů do jednotlivých prognostických skupin je zásadní kombinace metod konvenční a molekulární cytogenetiky s metodami molekulární genetiky (Sangerovo sekvenování/sekvenování nové generace). Jedním z výrazných nezávislých prognostických faktorů je komplexní karyotyp, který bez ohledu na své složení negativně ovlivňuje celkové přežívání pacientů. Výsledky probíhajících klinických studií pak mohou určit efektivní strategii léčby těchto pacientů, popř. nemocných s dalšími prognosticky negativními aberacemi (delecemi genů *ATM* a *TP53*).

4.2 Delece dlouhých ramen chromozomu 6

Výsledky této studie jsou uvedeny v publikaci Jarosova M, Hrubá M, Oltová A, Plevová K, Kruzová L, Kriegová E, Fillerová R, Koritaková E, Doubek M, Lysák D, Procházka V, Mraz M, Indrak K, Papajik T: Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients. *American Journal of Hematology*, 2017;92(10):E604-E607; viz Příloha č. 3.

4.2.1 Soubor pacientů

Celkový soubor tvořilo 1158 pacientů diagnostikovaných dle iwCLL doporučení [12, 208] a sledovaných ve třech českých hematologických centrech (Olomouc, Plzeň a Brno) v letech 2000 až 2014. Všichni pacienti byli vyšetřeni jak klasickou cytogenetikou, tak metodou FISH. Delece v oblasti dlouhých ramen chromozomu 6 byla prokázána u 91 pacientů (7,8 %). Celkem 70 pacientů s delecí 6q bylo následně vyšetřeno metodou arrayCGH k určení rozsahu delece a stanovení kandidátních genů zapojených do patogeneze CLL.

V blíže studovaném souboru bylo 53 mužů a 17 žen s mediánem věku v době diagnózy 63 let (rozmezí 34–87 let). Celkem 42 pacientů bylo vyšetřeno před zahájením terapie, 28 pacientů bylo již léčeno. Mutační stav *IGHV* byl vyšetřen u všech pacientů, 4 pacienti (5,7 %) měli mutované *IGHV*, 65 pacientů (92,9 %) mělo nemutovaný stav *IGHV* a u 1 pacienta (1,4 %) byly prokázány obě varianty. Základní charakteristika pacientů s delecí 6q je uvedena v tabulce 4 (Tab. 4).

Tab. 4: Základní charakteristika pacientů s delecí 6q

Pohlaví	N* (%)
Muži	53 (75,7)
Ženy	17 (24,3)
Věk v době diagnózy	Medián (rozmezí)
	63 (34–87)
Stádium dle Bineta	N (%)
A	24 (34,3)
B	23 (32,9)
C	19 (27,1)
Neurčeno	4 (5,7)
<i>IGHV</i> stav	N (%)
Mutovaný	4 (5,7)
Nemutovaný	65 (92,9)
Nevyšetřeno	1 (1,4)

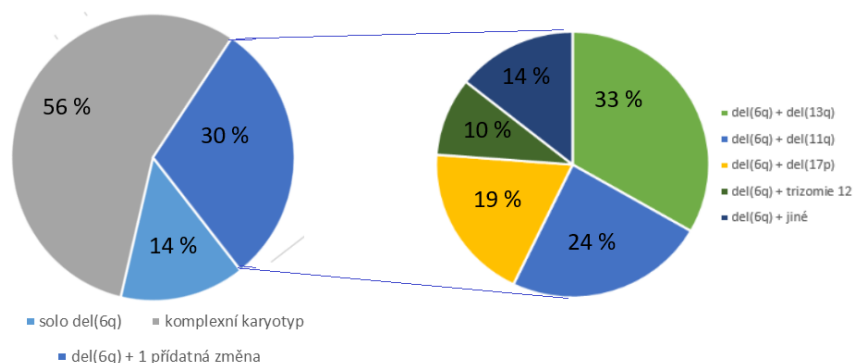
*N = počet pacientů

4.2.2 Výsledky

Cytogenetické výsledky

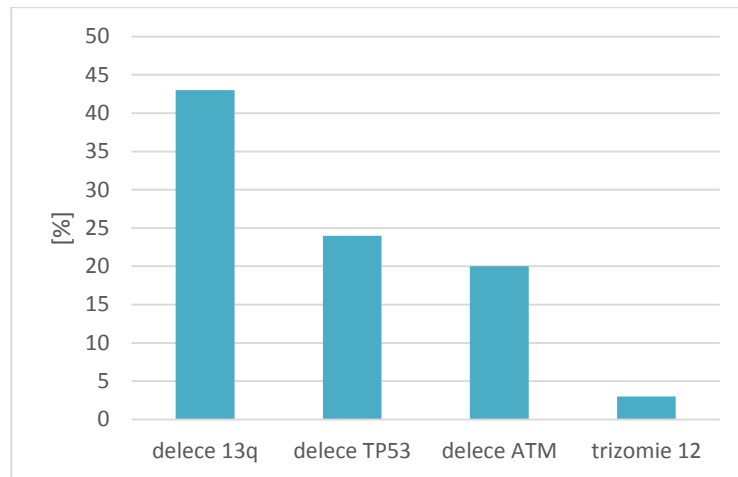
Delece v oblasti dlouhých ramen chromozomu 6 byla prokázána u 91 pacientů (7,8 %) a následné vyšetření metodou arrayCGH bylo provedeno u 70 pacientů s delecí 6q.

Delece 6q jako samostatná aberace byla prokázána pouze u 10 pacientů (14,3 %), u zbývajících 60 pacientů (85,7 %) byla kromě delece 6q prokázána i jiná změna. Komplexní karyotyp byl prokázán u 39 pacientů (55,7 %), dalších 21 pacientů (30 %) mělo jen jednu přídatnou změnu, nejčastěji se jednalo o delecí 13q (7 pacientů), delecí *ATM* (5 pacientů), delecí *TP53* (4 pacienti). Trizomie chromozomu 12 byla přítomna pouze u 2 pacientů (viz Obrázek 9).



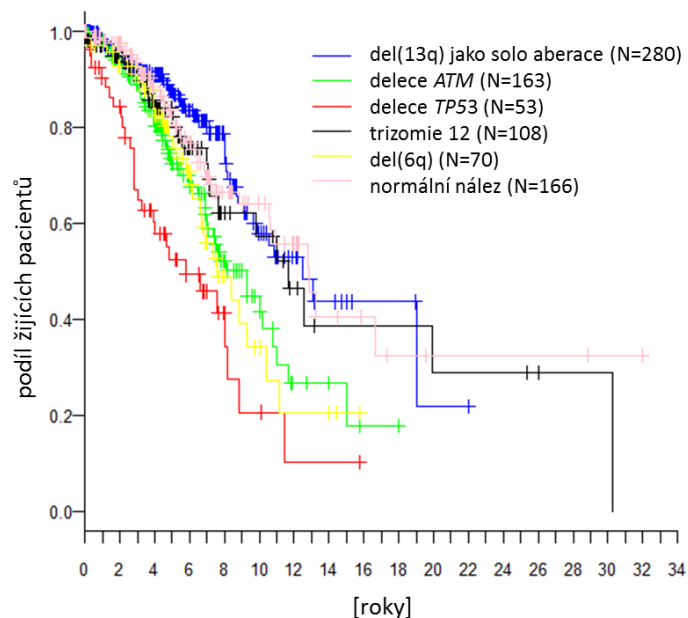
Obrázek 9: Procentuální zastoupení pacientů s delecí 6q jako samostatnou aberací, pacientů s delecí 6q a jednou přídatnou změnou a pacientů s delecí 6q jako součástí komplexního karyotypu

Bez ohledu na počet přídatných změn, delece 13q byla opět nejčastější přídatnou aberací (30 pacientů, 42,9 %), delece *TP53* byla prokázána u 17 pacientů (24,3 %), dále delece *ATM* u 14 pacientů (20 %) a trizomie 12 u 2 pacientů (2,9 %), (viz Obrázek 10).

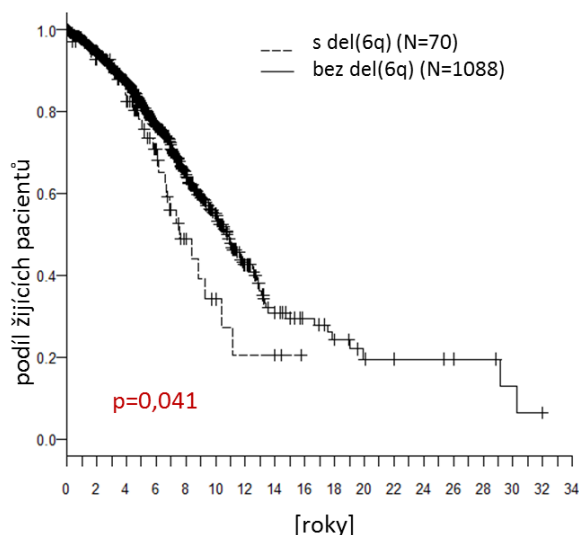


Obrázek 10: Prídavné změny u pacientů s delecí 6q a jejich procentuální zastoupení

Statistickou analýzou bylo prokázáno, že pacienti s delecí 6q mají kratší celkové přežívání a spadají do prognosticky rizikové skupiny, stejně jako pacienti s delecí *ATM* (viz Obrázek 11), a to bez ohledu na počet prídavných změn vyskytujících se v karyotypu společně s delecí 6q. Porovnáním skupin bez a s prídavnými změnami nebyly prokázány signifikantní rozdíly v žádném ze sledovaných znaků (stádium onemocnění dle Bineta, věk při diagnóze, procentuální zastoupení mužů/žen, mutační status *IGHV*, doba sledování ani celkové přežívání). Bylo však prokázáno horší celkové přežívání u pacientů s delecí 6q ve srovnání s pacienty bez této delecce (viz Obrázek 12).



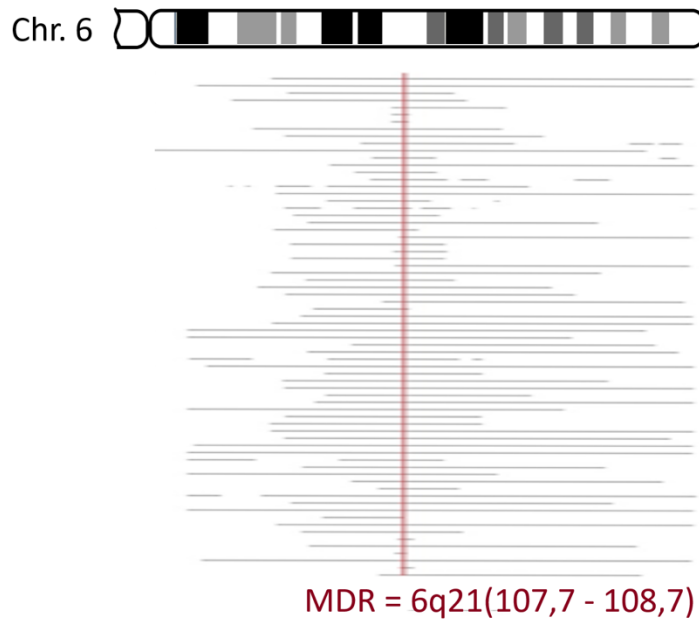
Obrázek 11: Porovnání celkového přežívání pacientů s rekurentními cytogenetickými aberacemi



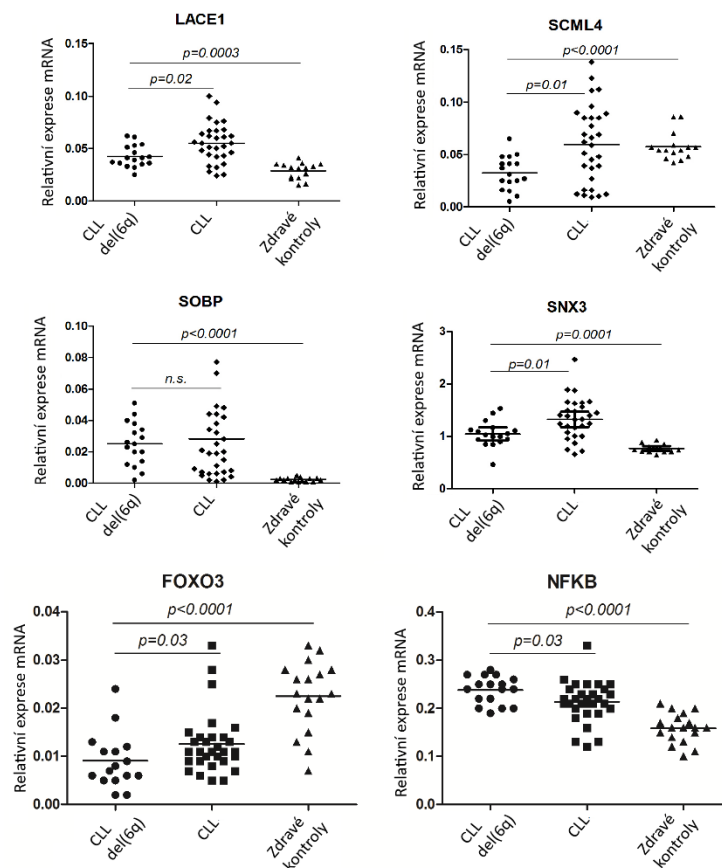
Obrázek 12: Celkové přežívání pacientů s a bez delece 6q.

Výsledky arrayCGH a stanovení relativní exprese kandidátních genů

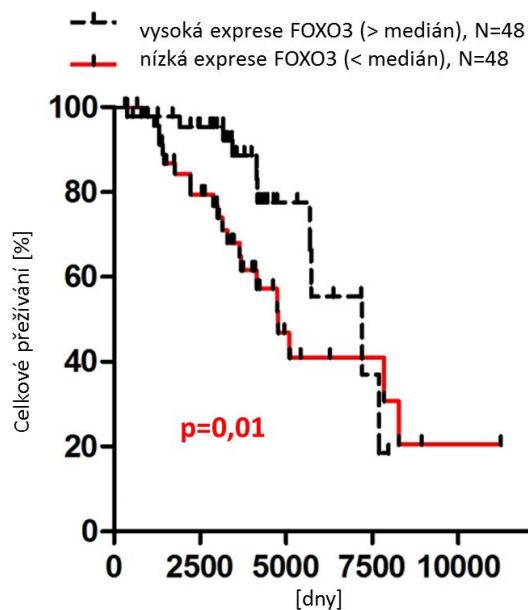
Metodou arrayCGH byla stanovena minimální deletovaná oblast (MDR, viz Obrázek 13) v pruhu 6q21 s 8 kandidátními geny: *SOBP*, *SCML4*, *SEC63*, *OSTM1*, *NR2E1*, *LACE1*, *FOXO3* a *ARMC2*. Pomocí metody RT-PCR byla stanovena relativní exprese mRNA (vyšetření bylo provedeno u 17 pacientů s delecí 6q, 30 CLL pacientů bez prokázané delece 6q a 19 zdravých kontrol). U pacientů s delecí 6q byla ve srovnání s CLL pacienty bez delece 6q a/nebo zdravými kontrolami prokázána nižší exprese genů *SOBP*, *SCML4*, *SNX3*, *LACE1* a *FOXO3*. Exprese genu *FOXO3* byla snižená u všech CLL pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami, nicméně u pacientů s delecí 6q byla exprese nejnižší (CLL s delecí 6q vs. CLL bez delece 6q: $p=0,03$; CLL s delecí 6q vs. zdravé kontroly: $p=<0,0001$). *FOXO3* je negativní regulátor buněčného cyklu a apoptózy [217], proto byla stanovena relativní exprese také jeho cílového genu *NFκB*, která byla signifikantně vyšší (viz Obrázek 14). Bylo také prokázáno kratší přežívání u pacientů s nízkou expresí *FOXO3* (> medián) oproti pacientům s vysokou expresí *FOXO3* (< medián) s hladinou významnosti $p=0,01$ (viz Obrázek 15).



Obrázek 13: Grafické zobrazení rozsahu delecí na dlouhém rameni chromozomu 6 (6q) a znázornění minimální deletované oblasti (červená linie)



Obrázek 14: Výsledky analýzy relativní exprese mRNA genů LACE1, SCML4, SOBP, SNX3, FOXO3 a NFkB u pacientů s delecí 6q (CLL del(6q)), pacientů bez delecce 6q (CLL) a zdravých kontrol.



Obrázek 15: Celkové přežívání pacientů s nízkou/vysokou expresí genu FOXO3.

4.2.3 Diskuze

Delece na dlouhém rameni chromozomu 6 je jednou z nejčastějších chromozomových aberací u lymfoidních malignit a většinou se jedná o sekundární událost související s progresí onemocnění [132]. Všeobecně je tato změna považována za negativní prognostický faktor [106,107]. V naší studii jsme prokázali delece v oblasti 6q u 7,8 % CLL pacientů, což odpovídá publikovaným datům, kde se tato delece vyskytuje u 7–10 % pacientů [125, 126].

Převážná většina pacientů (téměř 93 %) měla nemutovaný stav *IGHV*. Kromě nemutovaného *IGHV* mívají tito pacienti také vyšší leukocytózu s atypickou morfologií lymfocytů a pozitivitou znaku CD38, rozsáhlejší lymfadenopatii a splenomegalií [133]. I s ohledem na tento fakt bylo zřejmé zařazení těchto pacientů do horší prognostické skupiny. Celkové přežívání odpovídalo skupině pacientů s delecí *ATM* a ve srovnání se skupinou pacientů bez delece 6q bylo významně kratší ($p=0,01$).

U 86 % pacientů byla prokázána přídatná chromozomová změna a 56 % pacientů mělo delecí 6q jakou součást komplexního karyotypu. Nejčastějšími přídatnými aberacemi byly delece 13q, 17p a 11q. Delece genu *TP53* byla významně vyšší u pacientů s delecí 6q, než je běžné u CLL (24 % vs. 7 %) [125]. Naopak trizomie chromozomu 12 byla prokázána pouze u dvou pacientů (3 %), což je ve srovnání s 20 % CLL pacientů

výrazně nižší [10]. Rozdíly v OS však mezi skupinami pacientů s delecí 6q bez přídatných změn a s přídatnými změnami prokázány nebyly. Taktéž nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v ostatních sledovaných charakteristikách pacientů (stádium onemocnění dle Bineta, věk při diagnóze, procentuální zastoupení mužů/žen, mutační stav *IGHV*, doba sledování ani celkové přežívání).

Často deletovaná oblast na chromozomu 6 v pruhu q21 o velikosti 4–5 Mb již byla prokázána v práci Zhang a kol. [218]. Jednalo se o pacienty s B- a T-buněčnými lymfomy a akutní lymfoblastickou leukémií. Pomocí arrayCGH jsme byli schopni stanovit minimální deletovanou oblast v pruhu 6q21 o velikosti 1,1 Mb. Z 8 kandidátních genů byla u pacientů s delecí 6q prokázána nižší exprese genů *SOBP*, *SCML4*, *SNX3*, *LACE1* a *FOXO3* (ve srovnání s CLL pacienty bez delece 6q a/nebo zdravými kontrolami). Gen *FOXO3* je tumor-supresorový gen patřící do rodiny FOXO transkripčních faktorů s konzervovanou DNA vazebnou doménou, které jsou regulovány drahou PI3K. Transkripční faktory FOXO v lymfocytech negativně regulují buněčný cyklus a indukují buněčnou smrt [219]. FOXO3 aktivuje expresi transkripčních represorů Mad/Mxd rodiny, která je nezbytná k inhibici proliferace, i díky regulaci aktivity Myc [220]. Pacienti s nízkou expresí *FOXO3* (> medián) měli oproti pacientům s vysokou expresí *FOXO3* (< medián) výrazně kratší OS (13,1 vs. 19,8 let; $p=0,01$). Vzhledem k výše uvedenému a faktu, že chemokiny mohou ovlivňovat aktivitu tohoto transkripčního faktoru, *FOXO3* by mohl být vhodným terapeutickým cílem.

Můj podíl práce:

Osobně jsem prováděla většinu vyšetření FISH u pacientů olomouckého hematologického centra a také většinu arrayCGH vyšetření u vyšetřovaných pacientů s delecí 6q.

4.3 Zmnožení dlouhých ramen chromozomu 2

Výsledky této studie jsou částečně uvedeny v diplomové práci Mgr. Barbory Štefkové: Cytogenetika a molekulární cytogenetika u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) se zaměřením na zmnožení krátkého ramene chromozomu 2 (2p). Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Lenka Krůzová. Olomouc, 2019. Dostupné na: <https://theses.cz/id/98qad8>.

4.3.1 Soubor pacientů

Během let 2000 až 2018 bylo v našem centru vyšetřeno celkem 604 CLL pacientů (diagnostikovaných dle iwCLL doporučení z let 1996 a 2008 [12, 208]). Všichni byli vyšetřeni jak klasickou cytogenetikou, tak metodou FISH. Zmnožení krátkého ramene chromozomu 2 bylo prokázáno u 52 z nich (8,6 %), u kterých pak bylo doplněno vyšetření arrayCGH.

Soubor tvořilo 42 mužů a 10 žen s mediánem věku v době diagnózy 61 let (rozmezí 34–92 let). Mutační stav *IGHV* byl vyšetřen u 47/52 pacientů: 6 pacientů mělo mutovaný *IGHV* stav, z toho 3 pacienti (5,8 %) nesli subgeny *IGHV3-21*, 39 pacientů (75 %) mělo nemutované *IGHV* a u 2 pacientů byla sekvence na hranici 98 % (hraniční homologie, 3,8 %). Čtrnáct pacientů (27 %) bylo v klinickém stádiu onemocnění dle Bineta A, 20 pacientů (38 %) ve stádiu B a 16 pacientů (31 %) ve stádiu C. U dvou nemocných nebylo stádium dle Bineta stanoveno. Základní charakteristika pacientů se zmnožením 2p je uvedena v tabulce 5.

Tab. 5: Základní charakteristika pacientů se zmnožením 2p

Pohlaví	N* (%)
Muži	42 (81)
Ženy	10 (19)
Věk v době diagnózy	Medián (rozmezí)
	61 (34–92)
Stádium dle Bineta	N* (%)
A	14 (27)
B	20 (38)
C	16 (31)
Neuvedeno	2 (4)
IGHV stav	N* (%)
Mutovaný	3 (5,8 %)
Mutovaný (<i>IGHV3-21</i>)	3 (5,8 %)
Nemutovaný	39 (75 %)
Hraniční homologie	2 (3,8 %)
Nevyšetřeno	5 (9,6 %)

*N = počet pacientů

4.3.2 Výsledky

Zmnožení oblasti krátkého ramene bylo prokázáno u 52 pacientů (8,6 %). Nejčastějšími přídatnými změnami byla delece 13q (35 pacientů, 67 %) následovaná delecí 11q (26 pacientů, 50 %). Duplikace 8q byla prokázána u 9 pacientů (17 %), delece 17p u 8 pacientů (15 %), delece 6q u 4 pacientů (8 %) a trizomie chromozomu 12, ztráta 1 kopie *IGH* a přestavba genu *IGH*, každá pouze u jednoho pacienta. V převážné většině (81 %) bylo zmnožení 2p součástí komplexních karyotypů (43 pacientů, z toho 7 pacientů s prokázaným výskytem min. 3 chromozomových aberací, včetně 2p, v jednom klonu i navzdory neúspěšnému cytogenetickému vyšetření). Čtyři pacienti pak komplexní karyotyp vyvinuli v dalším průběhu onemocnění. U 5 pacientů byly prokázány jumping translokace duplikované části krátkých ramen chromozomu 2 na různé, zřejmě náhodné chromozomy (3 pacienti měli mezi recipientními chromozomy chromozom 13, chromozomy 3, 4, 10, 15, 20, 21, 22 byly zahrnuty v jumping translokacích dvakrát). Osm pacientů mělo dicentrické chromozomy, nejčastěji (celkem 4x) se jednalo o dicentrický chromozom dic(2;18)(p?10;p?10), u dvou pacientů o dic(2;20)(p?10;p?10). Osmnáct pacientů pak mělo translokaci duplikované části 2p na jiný chromozom, nejvíce do vzájemných přestaveb vstupovaly chromozomy 11 (3x), 18 (3x) a 13 (2x). U jednoho pacienta nebyla prokázána žádná další změna pomocí FISH ani arrayCGH (kromě ztrát heterozygoty na dlouhých ramenech chromozomů 8 a 13).

Cytogenetické vyšetření však bylo neúspěšné a nelze s jistotou říci, zda se v karyotypu nenachází případné balancované translokace. Zbývající pacienti měli prokázánu jen jednu přídatnou změnu (deleci 11q, 13q nebo translokaci). Výsledky cytogenetického vyšetření (závěrečné karyotypy) jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6: Výsledky FISH a závěrečné karyotypy u pacientů se zmnožením 2p

Pacient č.	Mutační stav <i>IGHV</i>	Závěrečný karyotyp
M/1†	MU (VH3-21)	46,X,der(Y)t(Y;8)(q?12;q?23)dup(8)(q22.2q24.3),del(13)(q14.2q14.3)[11]/ 46,XY,+2,dic(2;18)(q?12;p?18),del(13)(q14.2q14.3)[4]/ 46,XY[2]
M/2†	UNM	46,XY,der(11)del(11)(q14.1q25)t(2;11)(p?12;q?13)dup(2)(p25.3p21),del(13)(q14.11q14.3)[7]/ 46,XY[7]
M/3	UNM	47,XY,+12[2]/ 47,XY,der(3)dup(3)(q21.2q29)t(3;3)(q21.2;p25.3)del(3)(p26.3p25.3),+12,der(15)t(2;15)(p14;q26.1)[52]/ 46,XY[2]
M/4	UNM	47,XY,i(2)(p11.1)[12]/46,XY[2]
Ž/5†	UNM	46,XX,der(1)t(2;10;9;1)(p14;q26;p?23;q?42)dup(2)(p25.3p14),del(10)(q26.2q26.3),del(11)(q22.1q23.3)[12]/ 46,XX,del(11)(q22.1q23.3)[5]
M/6	UNM	*dup(2p),del(11q),del(13q)
M/7†	ND	*dup(2p),del(11q),del(13q),del(17p)
M/8	UNM	47,XY,+i(2)(p11.2),del(11q)(q14.1q23.3),del(13)(q?14.2q?14.3)[49]/ 46,XY,trp(2)(p?25.3p?11.2),del(11q)(q14.1q23.3),del(13)(q?14.2q?14.3)[5]/ 47,XY,+der(2)del(2)(q10?qter)t(2;?)(q11;?),del(11q)(q14.1q23.3),del(13)(q?14.2q?14.3)[4]/ 46,XY,del(11q)(q14.1q23.3),del(13)(q?14.2q?14.3)[4]/ 46,XY[20]
M/9†	UNM	*dup(2),del(11),del(13)
M/10	UNM	46,XY,dic(2;20)(q?11;p?11),+2[27]/ 46,XY[76]
M/11†	UNM	*dup(2),del(11),del(13)
M/12†	UNM	46,XY,i(8)(q10),del(9)(p21),del(11)(q22),der(18)t(2;18)(p?11;p11)[2]/ 45,X,-Y,i(8)(q10),del(9)(p21),del(11)(q22),der(18)t(2;18)(p?11;p11)[6]/ 46,XX[2]
M/14†	UNM	44,XY,+i(2)(p10),der(3)t(3;8)(?p;q?23),-8,del(13)(q14),?dic(13;17)(p11;p11)del(13)(q14),?dic(18;19)(?p11;?q)[12]/ 46,XY[3]

Pacient č.	Mutační stav <i>IGHV</i>	Závěrečný karyotyp
M/15†	MU (VH3-21)	46,XY,der(22)t(2;22)(p?;p13)[6]/ 46,XY,der(8)t(2;8)(p?;p?) [2]/ 46,XY,der(3)t(2;3)(p?;?) [1]/ 46,XY,der(16)t(2;16)(p?;?) [1]/ 46,XY,der(20)t(2;20)(p?;?) [1]/ 46,XY,der(21)t(2;21)(p?;p13)[1]/ 46,XY,der(Y)t(2;Y)(p?;p?) [1]/ 46,XY[5]/
M/16†	ND	*dup(2p),del(13q), del(17p)
M/17†	hr. homol.	46,XY,dic(2;18)(p?10;p?11),+2,i(8)(q?10),del(11)(q14.2q22.3),del(13)(q14.2)[9]/ 46,XY,del(11)(q14.2q22.3),del(13)(q14.2)[2]
Ž/18	UNM	*dup(2p),del(13q)
M/19†	UNM	46,XY,der(1)dup(2p)(p25.3p14)t(1;2)(q?;p13),i(5)(p?14),der(17)t(5;17)(q?23;p13)del(17)(p13.3p12),der(18)del(18)(p11.32p11.21)t(18;21)(p11;q22)dup(21)(q21.31q22.3)[8]/ 46,XY[4]
M/20	UNM	*dup(2p)
Ž/21†	UNM	44,XX,-8,der(11)del(11)(p15.5p15.5)del(p15.4p15.4)del(p14.3p12)del(q14.1q25),-13, der(13)t(2;13)(p?12;p?12)dup(2)(p25.3p14),der(17)del(17)(p13.3p13.2)t(X;17)(q?;p?13)dup(X)(p22.33p11.3),der(18)t(8;18)(q?11;p?11)[28]/ 46,XX[2]
M/22	MU (VH3-21)	46,XY,del(11)(q14.1q21;q22.2q23.3),del(13)(q14.13q21.32)[7]/ 46,XY,dic(2;18)(q?10;p?10),+2,del(11)(q14.1q21;q22.2q23.3),del(13)(q14.13q21.32)[5]/ 46,XY[2]
Ž/23	UNM	46,XX,del(11)(q13.5q23.3),del(17)(q25.1q25.3),der(20)t(2;20)(p14;q?33)dup(2)(p25.3p14)[23]/ 46,XX,der(20)t(2;20)(p14;q?33)dup(2)(p25.3p14)[3]/ 46,XX[3]
M/24†	UNM	45,XY,der(2)t(2;4)(p?25;?)ins(2;13)(p?;q?),?dic(17;22)(p12;p11)t(11;17)(q?24;p?),der(13)(p24)t(2;13)(p24;q?13)[4]/ 45,XY,der(2)t(2;15)(p?25;q?),der(13)t(2;13)(p24;q?13),t(2;?)(?;?) [3]/ 46,XY[5]
M/25	MU	*dup(2p),del(13q),del(17p)
M/26†	UNM	*dup(2p),del(11q),del(13q)
M/27†	MU	45,XY,dic(2;10)(p?23;q?26)cth(2),t(7;8)(q?31;q?21)dup(8)(q22.2q22.3),del(11)(q13.1),del(14)(q32.33),i(17)(q11.1)[3]/ 46,XY[11]

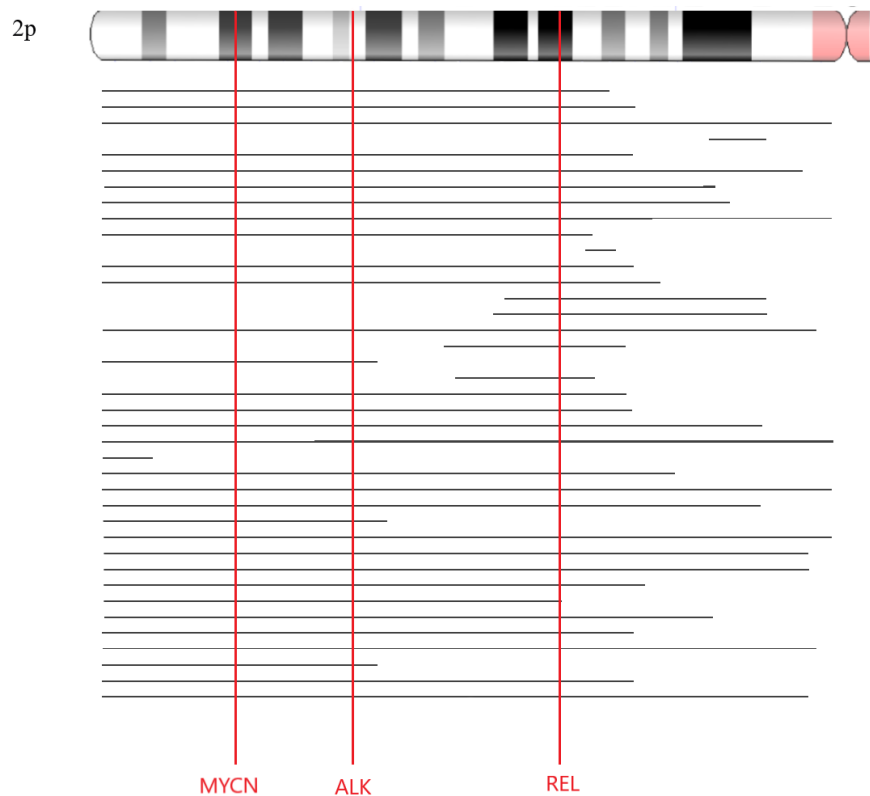
Pacient č.	Mutační stav <i>IGHV</i>	Závěrečný karyotyp
M/28	UNM	46,XY,+2,dic(2;18)(q?11;p?11),t(2;13)(q?33;q?13),del(13)(q14.2q14.3)[12]/ 46,XY,der(20)del(20)(p13p12.3)t(13;20)(q?13;p?11)del(13)(q14.2q14.3)[6]/ 46,XY,t(2;13)(q?33;q?13),del(13)(q14.2q14.3)[3]
M/29†	ND	44-46,XY,del(6)(q16.3q25.3),dic(2;14)(q11;p11.2),+2,der(17)t(8;17)(q?23;p?12)dup(8)(q22.3q24.3)[10]/ 46,XY[2]
M/30†	UNM	48,XY,+7,ins(9;3)(p?21;q?25q?28),ins(9;3)(p?21;q?25q?28),t(11;14)(q13;q32),+18[9]/ 49,XY,+7,ins(9;3)(p?21;q?25q?28),ins(9;3)(p?21;q?25q?28),t(11;14)(q13;q32),+13,+18[2]/ 46,XY,t(1;21;11;2)(p?21;q?22;q?13;p?12),ins(9;3)(p?21;q?25q?28),ins(9;3)(p?21;q?25q?28),t(11;14)(q13;q32)[4]/ 46,XY[5]
M/31	UNM	46,XY,del(11)(q?22q?25),22ps+[22]/ 46,XY,dup(2)(p?21pter),del(11)(q?22q?25),22ps+[4]/ 46,XY,del(11)(q?22q?25),der(19)t(2;19)(p?21;p?13)dup(2)(p?21pter),22ps+[2]/ 46,XY,del(11)(q?22q?25),der(20)t(2;20)(p?21;p?13)dup(2)(p?21pter),22ps+[2]/ 46,XY,der(10)t(2;10)(p?21;p?15)dup(2)(p?21pter),del(11)(q?22q?25),22ps+[1]/ 46,XY,22ps+[1]
Ž/32	UNM	46,XX,add(2)(p25.3p11.1),del(11)(q14.1q23.3)[9]/ 46,XX,add(2)(p25.3p11.1),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q?14)[2]/ 46,XX[1]
Ž/33†	UNM	46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21),t(9;13)(q?21;q?13),der(18)t(9;18)(?;p?11.2)[8]/ 46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21)t(9;22)(?;q?12),t(9;13)(q?21;q?13),der(18)t(9;18)(?;p?11.2)[3]/ 46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21),t(9;13)(q?21;q?13),der(16)t(11;16)(q?;q?),der(18)t(9;18)(?;p?11.2)[3]/ 46,XX[3]
M/34†	UNM	*dup(2p),del(11q)
M/35	UNM	46,XY,t(3;14)(?q?25;q?24),der(12)t(2;12)(p14;q24)dup(2)(p25.3p14)[13]/ 46,XY[2]
M/36	MU	46,XY,der(18)t(2;18)(q?14;q2?)[5]/ 46,XY[5]
M/37	UNM	46,XY,der(11)del(11)(q22.3q23.3)del(q25q25)t(2;11)(p?12;q?13)dup(2)(p25.p12),der(11)(p15.1p14.3)t(8;11)(q?13;p?14)dup(8)(q13.3q24.3),del(13)(q14.11q14.11)(q14.2q14.3), del(18)(p11.31p11.23)(q22.3q23)[10]
M/38	UNM	46,XY,+2,dic(2;20)(p11.1;p11.1),del(13)(q14.13q14.3)[6]/ 46,XY[2]
M/39	UNM	*dup(2p),del(11q),del(13q)

Pacient č.	Mutační stav <i>IGHV</i>	Závěrečný karyotyp
M/40†	ND	46,XY,der(3)del(3)(p26.3p25.3)t(3;8)(p?25;q?22)dup(8)(q22.1q24.3),der(8)del(8)(p23.3p12)t(3;8)(p?25;q?22)dup(3)(q25.31q29),del(13)(q14.2q14.3)[10]/ 46,XY[8]
M/41	UNM	46,XY,der(11)dup(2)(p25.3p13.2)t(2;11)(p13.2;q14.3)del(11)(q14.3q25)[49]/ 46,XY[1]
M/42	UNM	46,XY,t(13;14;15;17)(q?13;q?24;q?21;q?21)ins(14;6)(q?24;p?21)del(13)(q14.13q14.3)[9]/ 46,XY,der(18)t(2;18)(p?12;p?11)[3]/ 46,XY[32]
M/43†	UNM	*dup(2p),del(11q)
M/44†	UNM	44-45,XY,der(1)(p),t(2;21),der(3),der(4),-?8,-?9,t(12;17),?del(19)(q),+1-2mar[cp13]/ 46,XY[1]
Ž/45	hr. homol.	46,XX,der(7)t(2;7)(p?13;q?36)dup(2)(p?13p?ter),del(13)(q14),del(13)(q14)/ 46,XX[8]
M/46†	UNM	*dup(2p),del(6q),del(11q),del(13q)
Ž/47	UNM	46,XX,del(13)(q14.2q14.3),der(18)t(2;18)(p14;q21)dup(2)(p25.3p14)[2]/ 46,XX,del(13)(q14.2q14.3),der(9)t(2;9)(p14;q?32)dup(2)(p25.3p14)[2]
Ž/48†	UNM	43,X,-X,t(2;3)(?q22;p21)dup(2)(p?),der(4)t(4;13)(?q35;p11)del(13)(q12.13q21.31),dic(9;11)(q21;q13)[4]/ 42,X,-X,?dic(2;3)(?q;?q)t(2;3)(?q;?q)t(2;8)(?p;?q)dup(2p?),der(4)t(4;13)(?q35;p11),der(8)t(3;8)(?q;?q)ins(8;2)(?q;?q),dic(9;11)(q21;q13)[3]
M/49	UNM	47,XY,i(2)(p11.1),+2,del(13)(q?14)[30]
M/50†	UNM	46,XY,t(2;3)(?;?)dup(2)(p25.3p11.2),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q14.2q14.3)[2]/ 46,XY,del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q14.2q14.3),der(18)t(2;18)(?;?)dup(2)(p25.3p11.2)[2]/ 46,XY,der(7)t(2;7)(?;?)dup(2)(p25.3p11.2),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q14.2q14.3)[1]/ 46,XY,del(11)(q14.1q23.3),der(13)del(13)(q14.2q14.3)t(2;13)(?;?)dup(2)(p25.3p11.2)[1]/ 46,XY,der(9)t(2;9)(?;?)dup(2)(p25.3p11.2),del(13)(q14.2q14.3),der(18)t(11;18)(?;?)del(11)(q14.1q23.3)[1]
Ž/51	ND	47,XX,+i(2)(p10)[7]/ 47,XX,+i(2)(p10),t(3;13)(p22;q14)del(3)(p23p22.3)del(13)(q14.2q14.3)[13]/ 46,XX,der(15)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;15)(p?11;q?26)[5]/ 46,XX,der(10)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;10)(p?11;p?15)[3]/ 46,XX,der(13)del(13)(q14.2q14.3)t(2;13)(p?11;p?11)dup(2)(p25.3p11.2)[3]/ 46,XX,der(21)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;21)(p?11;p?11)[3]/ 46,XX,der(22)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;22)(p?11;p?11)[1]/ 46,XX,der(X)dup(2)(p25.3p11.2)t(X;2)(p?22;p?11)[1]/ 46,XX[4]

Pacient č.	Mutační stav IGHV	Závěrečný karyotyp
M/52	UNM	46,XY,+i(2)(p11.2),-8,del(11)(q13.5q24.2),der(21)t(8;13;21)(q?21;q?14;?)dup(8)(q21.11q24.3)del(13)(q14.11q14.3)[5]/46,XY[5]
M/53†	UNM	*dup(2p),del(6q),del(11q),del(13q),dup(8q)

Legenda: M (muž), Ž (žena), † (pacient zemřel), MU (mutovaný), UNM (nemutovaný), hr. homol. (hraniční homologie s germinální sekvencí IGHV – 98 %), nd (nevyšetřeno), uns (neúspěšné)

Metodou arrayCGH bylo vyšetřeno 51 pacientů (1 pacient nebyl vyšetřen z důvodu nedostatku materiálu). Čtyři pacienti však měli nízké procentuální zastoupení patologických buněk a dalších 9 pacientů mělo nízké zastoupení patologického klonu buněk se zmnožením 2p, u těchto pacientů tak nebylo možné určit rozsah zmnožení na chromozomu 2. Rozsah zmnožení u zbývajících pacientů byl značně heterogenní, většinou se jednalo o duplikaci celého krátkého ramene chromozomu 2. Nebylo proto možné určit minimální zmnoženou oblast, i s ohledem na limitovaný počet pacientů a dostupných výsledků arrayCGH. Díky tomu také bylo ustoupeno od původně plánované analýzy exprese potenciálních kandidátních genů v této oblasti. Grafické znázornění zmnožení na 2p je uvedeno na obrázku 16 a souhrnné výsledky arrayCGH pak v tabulce 7.



Obrázek 16: Grafické znázornění zmnožených oblastí na krátkém rameni chromozomu

Tab. 7: Výsledky arrayCGH

Pacient č.	Výsledek arrayCGH
M/1†	arr[GRCh37]13q14.2q14.3(48941714_51637034)x1,8q22.2q24.3(100829780_146294098)x3
M/2†	arr[GRCh37] 2p25.3p21(17019_44533462)x3,2p16.3p15(48086274_63985228)x3,8q11.21q11.23(51210232_54306826)x2 hmz, 11q14.1q25(79992712_134934196)x1,13q14.11q14.3(41264453_54490011)x1
M/3	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_67294799)x3,3p26.3p25.3(62199_11712047)x1,3q21.2q29(124267110_197837049)x3,(12)x3, 15q26.1q26.3(93143013_102399819)x1
M/4	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3
Ž/5†	arr[GRCh37] 2p25.3p14(44504_68524945)x3,10q26.2q26.3(129913184_135434178)x1,11q22.1q23.3(99121796_116973483)x1, ?15q11.1q11.2(20481702_22558756)x3
M/6	arr[GRCh37] 1p33p32.3(48482986_53589419)x2 hmz,?2p12p11.2(76510135_83844907)x3, 6p25.3p25.1(439231_4269759)x3,11q14.1q24.2(84477029_127297143)x1,13q14.2q14.3(50781612_51462302)x1
M/7†	arr[GRCh37] 1p36.3p34.3(846680_39806604)x1,1p34.3p33(39826419_47090908)x4,1p21.2p21.1(100892469_105737173)x2 hmz, 1q21.1q23.1(142727196_157652563)x3,1q23.1q44(157670441_249212668)x1,2p25.3p14(17019_66995748)x3,2q12.2q13(106719606_113754754)x2 hmz, 6q16.1q27(96061693_170911240)x1,7q31.32q31.33(122355640_125364853)x2 hmz, 10p15.3p11.1(102539_38789665)x1,10q11.21q22.3(42864605_81249841)x1,10q24.32q26.2(103424874_128613207)x1,10q26.3(130842118_135110353)x1, 11q13.5q23.3(75562624_116644398)x1,13q13.3q21.1(38627949_57793413)x1,13q21.1q34(59567078_115092648)x3,15q11.1q22.31(20055137_65298512)x1, 16p13.3p13.2(96766_9051815)x1,16p13.2p13.13(9141438_10777887)x4,16p13.13(10813122_11820119)x8,16p13.13p12.2(12117673_21574967)x3, 17p13.3p11.2(44684_22183006)x1,17q11.1q21.31(25300199_42960557)x1,17q25.1q25.3(71374894_80270154)x3,17q25.3(80294080_81036106)x1,20p12.1(14629123_15219086)x1
M/8	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_884328643)x3,11q14.1q23.3(83038154_121585073)x1
M/9†	arr[GRCh37] 2p25.3p12(235263_77340292)x3,11q14.1q23.2(78965050_115751183)x1,13q13.1(32231813_33944539)x1
M/10	pod hranicí detekce
M/11†	pod hranicí detekce
M/12†	arr[GRCh37] (Y)x0,2p25.3p12(17019_79180898)x3,8p23.3p11.1(191530_43541986)x1,8q11.1q13.2(47229005_68343898)x1, ?8q13.2(68832961_70498318)x1~2,?8q13.3(71238938_73440693)x1~2,8q13.3q24.3(73635634_146121090)x3, 9p24.1p21.1(8352705_30767166)x1~2,11q22.3q24.3(102936356_127970238)x1,?14q11.2q22.3(24328784_56729135)x1~2, ?15q26.2q26.3(95368273_99010585)x2~3,18p11.32p11.21(148963_15072794)x1,(Y)x0
M/13†	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92262019)x3,3p26.3p21.31(117735_49926729)x1,3p14.1p12.3(68927704_75279055)x1, 3p12.2p12.1(81523854_85098226)x1,3p12.1p11.1(85896326_90400870)x3,8p23.3p23.1(191530_8221982)x1, 8p23.1p22(12404003_17984875)x1,8p12p11.21(29000703_40886605)x1,8q11.1q11.21(46924418_50207451)x1, 10q24.2q25.2(99895278_112105252)x1,13q13.3(36698309_38460730)x1,13q14.2q21.32(49122864_66982944)x1, 17p13.3p11.2(84287_22003066)x1,18p11.32p11.21(184254_14103971)x1,?19p12(20216230_24376837)x3,?19q13.42q13.43(56167796_59063507)x1

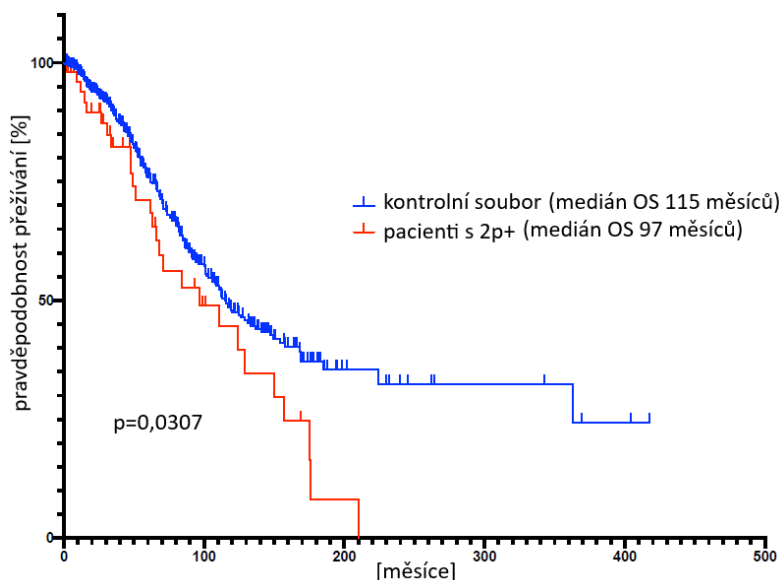
Pacient č.	Výsledek arrayCGH
M/14†	arr[GRCh37] 2p25.3p15(17019_61866471)x3,2q32.3q33.1(193286938_200763224)x2 hnz,4p16.3p15.1(72447_32548772)x1,5p14.3(18866362_23226235)x2 hnz,5q31.1q35.3(134365423_180691052)x3,8q11.21q11.23(50204476_54910006)x2 hnz,10q21.1q21.2(58391568_61785973)x2 hnz,11q14.3q23.3(89308592_116149746)x1
M/15†	arr[GRCh37] Xp22.33(60701_2685674)x0,Xq21.31(88512785_90085154)x0,(Y)x0,2p25.3p21(30341_47715127)x1,2p16.1p14(60932053_64790014)x3,2p14p13.3(66842948_69936266)x1,2p12(76891511_78537044)x1,2q11.1q13(95529039_113291495)x1,2q13q14.2(113331042_120099217)x3,2q14.2(120123060_120405084)x1,2q21.3(135837264_136147960)x1,6p22.3p21.1(15250020_43069406)x1,8q21.11q24.3(76258615_146280020)x3,13q14.13q14.3(45966109_52064658)x1,17p13.3p11.2(24457_18899368)x1,17p11.2(19143173_20675339)x3,17p11.2p11.1(21336799_22225638)x1
M/16†	arr [GRCh37] 11q14.2q22.3(87531917_109017352)x1,13q14.2(49794639_50377937)x1
Ž/17	arr[GRCh37] 2p25.3p11(?17019_89075755)x3,13q14.2q14.3(49829567_51764796)x1
M/18†	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_67073554)x3,5p15.33p14.1(2517569_26504031)x3,17p13.3p12(950505_15591491)x1,18p11.32p11.21(967553_15008646)x1,21q21.31q22.3(29332807_46269181)x3
M/19	arr[GRCh37] 2p25.3p13.3(17019_70488472)x3,8q11.21q24.3(48217908_146152184)x2 hnz,(13)x2 hnz
Ž/20†	arr[GRCh37]Xp22.33p11.3(60701_44036619)x3,2p25.3p14(17019_68100221)x3,8p23.3q11.22(61774_52320614)x1,8q12.1q13.2(60733056_69978446)x1,11p15.5p15.5(196966_1996800)x1,11p15.4p15.4(3645310_5574014)x1,11p14.3p12(24616945_39271543)x1,11q14.1q25(82413892_134934196)x1,13q11q12.12(19024748_25301612)x1,13q13.2q34(34263793_115092648)x1,17p13.3p13.2(1693_5935643)x1
M/21	arr[GRCh37] ?2p16.3p16.2(50792617_53685611)x3,?2p12p11.2(76316196_83844907)x3,11q14.1q21(77386791_92950877)x1,11q22.2q23.3(102147226_116093284)x1,12q21.2q21.31(78964958_83019188)x2 hnz,13q14.13q21.32(47091739_68059049)x1
Ž/22	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_65574538)x3,11q13.5q23.3(75870291_117965282)x1,17q25.1q25.3(74404855_75413830)x1
M/23†	pod hranicí detekce
M/24	arr[GRCh37] (1-4,6-17,21,22,X,Y)cx
M/25†	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(61060_90133447)x3,11q14.1q23.3(83344386_118714084)x1,13q14.2(50368875_50546925)x1,17q22q23.2(50511537_60118579)x3,17q25.1q25.3(72366509_80215871)x3
M/26†	arr[GRCh37] 1q21.3q44(152453240_249166593)x2 hnz,2p21(43142825_44637779)x3,2p21(44664433_45685787)x1,2p21p16.3(45739484_50823100)x3,2p16.1p14(57692648_66033455)x3,2p13.1p12(74099992_75729253)x1,2p12(78970764_79706557)x1,2q14.2q14.3(121334064_126722063)x1,2q32.1q33.1(187922705_200676541)x3,2q32.3q33.1(193127346_199052600)x2 hnz,2q33.3q35(207210462_216748567)x3,2q37.1q37.3(234832485_239093573)x3,8q22.2q22.3(100990011_101970085)x3,11q13.1(64775062_65727456)x3,17p13.3p11.2(48539_22183006)x1, 17q11.1q25.3(25343175_81044553)x3,17q11.1q12(25468600_32739642)x2 hnz,17q22q24.2(57455620_64387069)x2 hnz
M/27	arr[GRCh37] 13q14.2q14.3(47374693_52138508)x1,20p13p12.3(4709272_5224997)x1,20p12.3(7103757_7508659)x1
M/28†	arr [GRCh37] 2p25p11.2(17019_34777748)x3,6q16.3q25.3(102886426_158513393)x1,8q22.3q24.3(102720865_98080970)x3

Pacient č.	Výsledek arrayCGH
M/29†	arr[GRCh37] 2p21p16.3(44518307_48733620)x3,2p16.1(56345448_56502361)x1,2p16.1(57398346_57906726)x1,2p16.1p15(58803074_62137798)x3,2p12(77312793_77968695)x1,3q25.1(150308796_150670902)x1,3q25.1(150699987_151560019)x3,3q25.1q25.2(151598781_152160975)x1,3q25.2q28(152203378_190896823)x3,3q28(190930274_192292314)x1,5q23.3q31.1(130143669_132219037)x1,(7)x3,8p23.1p21.3(6502461_23283299)x1,8p23.1(7239491_8079920)x0,9p24.3p13.2(207454_37125911)x2 hnz,9p22.3(14429257_14949084)x0,9p21.3(21920518_22707857)x0,9p21.3(22733912_25067482)x1,9p21.3(24262251_24313081)x0,9p12p11.2(43469486_43841603)x1,?10q11.22(46949255_48124262)x1,13q14.2q14.3(50500134_51523074)x1,?17q12q21.2(32783987_39596611)x2 hnz,(18)x3,20p11.23(18331035_21077435)x2 hnz,20q11.23q13.31(35318605_55988288)x1,22q11.21(18706001_21505417)x3
M/30	pod hranicí detekce
Ž/31	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3,11q14.1q23.3(79324026_118940294)x1
Ž/32†	arr[GRCh37] Xq25q26.3(127944087_135002573)x2 hnz,1q31.1q31.3(190073382_193883256)x2 hnz,2p16.1p15(58288588_62563218)x4~5,3q26.31q26.32(173810957_176937896)x2 hnz,5q35.3(177630094_179019853)x1,9p21.3(21200740_22733971)x0~1,9p21.3p21.2(22756866_26743237)x1,9q21.11q21.12(71046033_72561425)x1,9q21.13(74030565_75252288)x1,9q21.13(75679946_75987507)x1,9q21.13(76698529_77396698)x1,9q21.33(87019109_88989739)x1,9q22.1q22.31(91143188_94125339)x1,9q22.31(95590065_96481219)x1,9q22.33q31.1(99711576_106212127)x1,9q31.2q31.3(110078757_111518899)x1,9q31.3(114543420_114828492)x1,9q32(115899868_116536428)x1,9q33.2(123374564_123835439)x1,9q33.2q33.3(124897767_127480985)x1,9q34.3(139665148_140309179)x1,13q14.11(42949750_43008771)x1,13q14.11(43455232_43987235)x1,13q14.11q14.1(44311991_46197695)x1,13q14.1q21.32(46566052_68359448)x1,13q21.33(70126170_70286551)x1,13q21.33q22.2(70639188_75849409)x1,13q22.2(76169404_76927740)x1,13q22.3(77244646_78641831)x1
M/33†	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_109900976)x3,11q22.2q25(101871767_134331081)x1
M/34	arr[GRCh37] 2p25.3p14(20777_66898803)x3
M/35	arr[GRCh37] 21q21.2q22.3(25036672_48090317)x3
M/36	arr[GRCh37] 2p25.p12(10702_83248070)x3,8q13.3q24.3(72972750_146293435)x3,11p15.1p14.3(17782804_23983072)x1,11q22.3q23.3(107391362_116629101)x1,11q23.3q23.3(116672303_120308128)x3,11q25q25(133305633_134934196)x1,12p13.32p13.31(4260747_7853479)x2 hnz,13q14.11q14.11(42218165_42660542)x1,13q14.2q14.3(49581965_51672767)x1,18p11.31p11.23(4390986_7112200)x1,18q22.3q23(70130064_78010032)x1
M/37	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_922632019)x3,13q14.13q14.3(47091739_51229962)x1,20p13p11.1(607407_26312663)x1,?18q12.1q12.3(24807314_41068920)x3
M/38	arr[GRCh37] 2p25.3p25.2(44504_6354309)x3,2p12p11.2(76510135_83911001)x3,13q14.2q14.3(48886744_51541846)x1,13q22.3q31.1(77402506_80608912)x2 hnz
M/39†	arr[GRCh37] 3p26.3p25.3(62199_10742366)x1,3q25.31q29(155406126_197861598)x3,8p23.3p12(119720_33791636)x1,8q22.1q24.3(94543197_146128791)x3,?11p13p12(35643941_40558241)x2 hnz,?12q15q21.2(71054305_77544170)x2 hnz,13q14.2q14.3(50516570_51764796)x1,17p12(12495048_13549498)x3
M/40	arr[GRCh37] 2p25.3p13.2(17019_72236601)x3,6p24.3p22.1(9062312_27713299)x2 hnz,11q14.3q25(91319752_134934196)x1
M/41	pod hranicí detekce
M/42†	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3,6p25.3p24.3(132043_8040808)x3,11q22.3q23.3(106560095_117646858)x1,18p11.32p11.21(64847_14158122)x1
M/43†	arr[GRCh37] 1p36.11p35.3(26342222_29262561)x1,1q21.1q21.3(145601454_152894510)x3,1q24.3q25.2(172759624_177852133)x3,1q31.3q44(196854206_249176203)x1,2p25.3p21(23938_45171162)x3,2p12(76316196_83090093)x3,6q22.31(122284521_125596650)x3,10q26.2q26.3(127728185_132748502)x3,12q13.12q13.13(50061704_52440336)x1,14q21.2q21.3(45941038_48593068)x3,16p13.3(5435829_6796905)x3,16q12.2(53779703_55544163)x3,17p13.2p13.1(4633908_7578257)x1,17q11.2(27245882_29667527)x1,17q25.1(72976958_73713052)x1

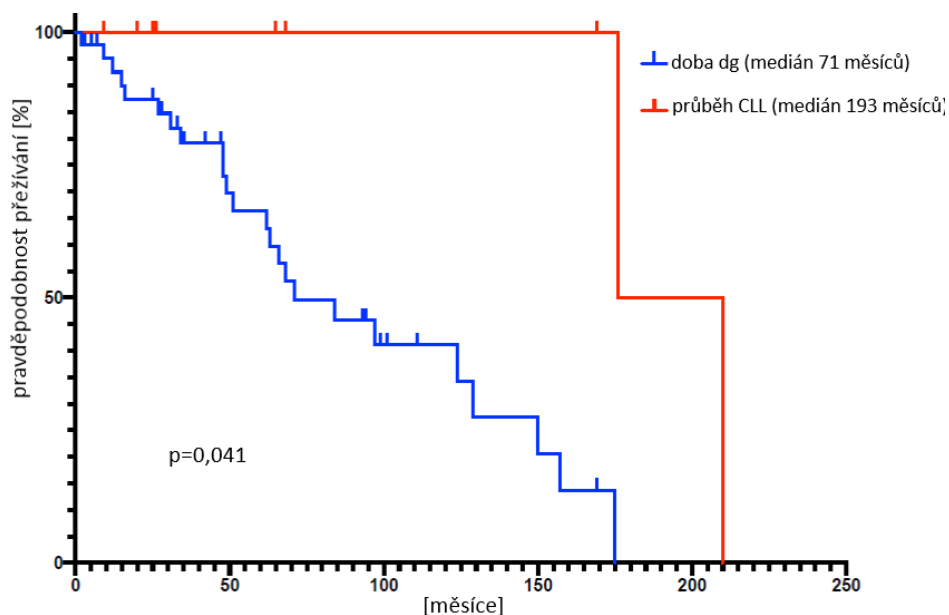
Pacient č.	Výsledek arrayCGH
Ž/44	pod hranicí detekce
M/45†	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_85035961)x3,2p22.3(33703730_35956680)x4,5q33.1q35.3(151697176_180696806)x3,?6q14.1q27(82549233_167705549)x1,7p22.3p12.3(54185_46889809)x3,8p23.3p11.1(428130_43394163)x1,8q11.1q13.2(47456485_70006435)x1,11q14.3q23.3(90337751_117844666)x1,12q24.33(131310205_133773528)x1,13q14.11q34(42604898_115092648)x1,17p13.2p11.2(5849357_16260198)x2 hmz,?17q21.33q22(50067819_51146049)x3,17q22q25.3(56739829_81044553)x3
Ž/46	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_67703600)x2~3,13q14.2q14.3(50572617_51501609)x1,20q11.21q13.33(31521185_62829958)x2 hmz
Ž/47†	arr[GRCh37] (X)x1,9q21.13q34.2(74235750_136431359)x1,11q13.5q23.3(75547969_120395006)x1,13q12.13q21.31(25739332_61860451)x0
M/48	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3
M/49†	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_89109964)x3,10q21.1(55970290_58826684)x2 hmz,11q14.1q23.3(78364494_116304026)x1,13q14.2q14.3(50516570_51711408)x1
Ž/50	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_89160192)x3,3p23p22.3(31644716_32365048)x1~2,13q14.2q14.3(50500134_51841299)x1~2
M/51	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_89160192)x3,8q21.11q24.3(76372418_141070902)x3,11q13.5q24.2(77014699_124810014)x1,13q14.11q14.3(41184150_53215470)x1,13q14.2q14.3(50544724_51501609)x0,13q12.3q13.1(29049784_32893791)x2 hmz,13q13.1q13.3(33277086_36154966)x2 hmz,13q13.3(36783312_39948767)x2 hmz,13q21.31q21.33(64191061_69644972)x2 hmz,13q21.33q31.1(70007016_80399492)x2 hmz,13q31.1q31.2(81434585_89241406)x2 hmz,13q31.2q31.3(89362784_94284016)x2 hmz,13q33.2q34(105928571_113581291)x2 hmz
M/52†	arr[GRCh37] 6q21(107598545_108219131)x1,8q21.2q24.3(64738426_63741905)x3,11q11q13.1(47574004_64485122)x1,11q22.3q25(46798326_133016325)x1,13q12.11q12.12(20360697_23584048)x1,13q14.2q14.3(48425685_51940068)x1

Legenda: M (muž), Ž (žena), † (pacient zemřel), nd (nevyšetřeno)

Statistickou analýzou bylo prokázáno, že pacienti se zmnožením 2p mají kratší celkové přežívání, a tudíž horší prognózu. Medián přežívání u pacientů se zmnožením 2p byl 97 měsíců ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů bez zmnožení 2p a bez komplexních karyotypů (552 pacientů) s mediánem OS 115 měsíců ($p=0,0307$; viz Obrázek 17). U většiny pacientů (43 pacientů, 83 %) bylo zmnožení 2p prokázáno již v době diagnózy, u dalších 9 pacientů až v průběhu onemocnění (z toho u 3 pacientů však bylo vyšetření v době diagnózy neúspěšné). Rozdíl v přežívání mezi těmito dvěma skupinami byl však značný. Pacienti se zmnožením 2p při diagnóze měli medián OS 71 měsíců, z nich 24 pacientů již zemřelo (56 %). U pacientů se zmnožením 2p během klonálního vývoje byl medián OS 193 měsíců ($p=0,0041$, viz Obrázek 18) a v této skupině stále žije 7 pacientů (78 %).



Obrázek 17: Celkové přežívání u pacientů se zmnožením 2p vs. bez zmnožení 2p a komplexního karyotypu
*2p+ (zmnožení 2p)



Obrázek 18: Celkové přežívání u pacientů se zmnožením 2p v době diagnózy vs. v průběhu onemocnění

4.3.3 Diskuze

Metodami konvenční i molekulární cytogenetiky bylo prokázáno zmnožení krátkých ramen chromozomu 2 u 52 pacientů (8,6 %), 42 mužů a 10 žen s mediánem věku při diagnóze 61 let (rozmezí 34–92 let). I když se procentuální zastoupení této aberace v jednotlivých studiích liší, většinou je postiženo 2–8 % nemocných [158, 159], což souhlasí s našimi výsledky. Vyšší zastoupení zmnožení 2p by mohlo být způsobeno nenáhodným výběrem pacientů v jednotlivých studiích. V práci Chapiro a kol. bylo zmnožení 2p zastíženo u 28 % neléčených pacientů, nicméně jednalo se o soubor nemocných s pokročilým stádiem onemocnění (B nebo C dle Bineta) [221]. V našem souboru pacientů bylo v pokročilém stádiu onemocnění 36 pacientů (69 %).

Celkem 75 % pacientů mělo nemutovaný stav *IGHV*, 6 % pacientů mutovaný stav *IGHV* (subgen *IGVH3-21*), jehož negativní prognostický vliv byl prokázán již několika studiemi [24, 222], a 2 pacienti měli homologii s germinální sekvencí na hranici 98 %. I když se u nich tedy nedal určit mutační stav *IGHV* se 100% jistotou, je možné, vzhledem k práci Jain a kol., tyto pacienty zařadit také do skupiny s horší prognózou. Celkem tedy 44 pacientů ze 47 vyšetřených (94 %) spadalo z hlediska mutačního stavu *IGHV* do horší prognostické skupiny. To je v souladu s publikovanými daty hned

několika prací, kdy zmnožení na 2p jednoznačně koreluje s nemutovaným stavem *IGHV* [163, 164].

Zmnožení oblasti krátkého ramene chromozomu 2 bylo součástí abnormálních, většinou komplexních karyotypů (81 %). Pouze u jednoho pacienta nebyla prokázána žádná přídatná změna. U zbývajících pacientů byly nejčastějšími přídatnými změnami delece 13q (67 %), delece 11q (50 %), duplikace 8q (17 %), delece 17p (15 %) a delece 6q (8 %). To je v souladu s publikovanými daty, kde se dále uvádí, že je zmnožení 2p součástí různých derivovaných chromozomů a dalších, často komplexních chromozomových změn, které souvisejí s progresí onemocnění [158, 159]. O tom svědčí i fakt, že 4 pacienti bez komplexních změn v karyotypu nakonec v průběhu onemocnění komplexní karyotyp vyvinuli.

Součástí komplexních karyotypů byly kromě nebalancovaných translokací s různými chromozomy také dicentrické chromozomy, nejčastěji dicentrický chromozom dic(2;18)(p?10;p?10), což popsala již Jarošová a kol. ve své práci v roce 2010 [158], a jumping translokace duplikované části 2p na různé chromozomy. Jumping translokace jsou charakterizovány jako translokace části jednoho chromozomu na dva či více recipientních chromozomů [223]. Jejich vznik je pravděpodobně několikastupňový proces, ke kterému přispívají jak zkrácené telomery, tak dekondezace pericentromerického heterochromatinu, nestabilita chromozomů, nelegitimní rekombinace, popř. virová infekce [224-227]. U recipientních chromozomů dochází často ke zlomu v centromerické či pericentromerické oblasti, málokdy v oblasti telomerické. Bez ohledu na typ malignity vedou nadpočetné kopie částí dárcovských chromozomů ke klonální progresi onemocnění díky onkogenům ve zmnožených oblastech [228, 229]. Vyskytují se u celé řady hematologických či jiných malignit [224, 228-231] a bývají asociovány s agresivním průběhem onemocnění a špatnou prognózou [231-233].

Metodou arrayCGH jsme se snažili určit minimálně zmnoženou oblast na 2p s kandidátními geny, u nichž by byla následně dovyšetřena exprese. Nicméně u většiny pacientů docházelo ke zmnožení celých krátkých ramen chromozomu 2 a u zbývajících pacientů byl rozsah zmnožení značně heterogenní, což určení minimálně zmnožené oblasti a potenciálních genů zapojených do patogeneze CLL znemožňovalo. Z publikovaných dat vyplývá pravděpodobnost ovlivnění exprese onkogenů *REL* (2p16, transkripční faktor NF- κ B rodiny), *ALK* (2p23, receptor tyrozin kinázy anaplastického

lymfomu) a *MYCN* (2p24, transkripční faktor MYC rodiny), které jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu a proliferace [158, 160, 161, 234, 235].

Medián celkového přežívání pacientů se zmnožením 2p byl 97 měsíců, což bylo ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů bez zmnožení 2p a komplexních karyotypů signifikantně nižší ($p=0,0307$). U většiny pacientů (83 %) bylo zmnožení 2p prokázáno již v době diagnózy, což je v rozporu s publikovanými daty, které uvádí, že je zmnožení 2p spíše sekundární událostí spojenou s klonálním vývojem a progresí onemocnění [159]. Přikláníme se tedy k výsledkům práce Fabris a kol., kde bylo prokázáno, že zmnožení 2p může být přítomno již v raných fázích onemocnění, zejména u pacientů s dalšími negativními prognostickými znaky [164].

V průběhu onemocnění získalo zmnožení 2p 9 pacientů. Porovnáním celkového přežívání pacientů se zmnožením 2p při diagnóze a v průběhu onemocnění bylo prokázáno výrazně horší přežívání u pacientů se zmnožením 2p již v době diagnózy (71 měsíců vs. 193 měsíců, $p=0,0041$). U pacientů se ziskem 2p v průběhu onemocnění tedy zřejmě záleží kromě doby uběhlé od stanovení diagnózy i na předchozích liniích léčby.

Můj podíl práce:

Tuto studii jsem navrhla jako téma diplomové práce své studentky Mgr. Barbory Štefkové, provedla jsem většinu molekulárně-cytogenetických vyšetření metodou FISH, spolupracovala na vyšetření arrayCGH a podílela se na vyhodnocení a celkové interpretaci výsledků.

4.4 Komentáře k dalším publikacím

4.4.1 Improving risk-stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia using multivariate patient similarity networks

Turcsanyi, P., E. Kriegova, M. Kudelka, M. Radvansky, L. Kruzova, R. Urbanova, P. Schneiderova, H. Urbankova, and T. Papajik. 2019. Leukemia Research 79:60-68. Viz Příloha č. 2.

Jak už bylo uvedeno výše, u CLL pacientů je popsáno několik vysoce rizikových cytogenetických faktorů. Jedná se zejména o delece 11q, 17p (popř. mutace *TP53*) a komplexní karyotyp. Vzhledem k dostupným novým lékům, inhibitorům BCR signalizace, bylo našim cílem identifikovat nové podskupiny rizikových pacientů, kteří by se lišili prognózou a klinickým průběhem onemocnění, a určit klíčové prognostické faktory (klinické, laboratorní nebo demografické).

V celkovém souboru bylo 116 rizikových pacientů (diagnostikovaných v souladu s iwCLL kritérii) s delecí 11q, 17p/mutací *TP53* a/nebo komplexním karyotypem prokázanými v době diagnózy. V souboru se nacházelo 36 mužů a 80 žen s mediánem věku při diagnóze 63 let (s rozmezím 34–87 let). Kromě cytogenetických aberací a mutačního stavu *TP53* a *IGHV* byly určeny další parametry: věk, pohlaví, stádium dle Bineta, krevní obraz, hladina beta-2-mikroglobulinu, thymidin kinázy (TK) a laktát dehydrogenázy (LDH), přítomnost splenomegalie, lymfadenomegalie (> 5 cm) a indikace a odpověď na léčbu. Pro hodnocení a vizualizaci podobností a vztahů mezi klinickými, demografickými a laboratorními daty u jednotlivých pacientů byla použita metoda síťových konstrukcí na bázi analýzy nejbližšího souseda.

K rozdělení jednotlivých podskupin došlo na základě genetických aberací, přítomné lymfadenomegalie, splenomegalie a pohlaví. Další parametry se neukázaly být významnými v rámci členění vysoce rizikových pacientů na podskupiny. Na základě síťových dat tak byly stanoveny tři podskupiny:

1) P-I

Do skupiny spadalo celkem 34 pacientů (muži i ženy) s CK a současně delecí 11q, s celkovým přežíváním 71 měsíců.

2) P-II

Do skupiny spadalo celkem 47 pacientů (především muži) s delecí 11q,

s celkovým přežíváním 73 měsíců.

3) P-III

Do skupiny spadalo celkem 35 pacientů (muži/ženy s delecí 17p/mutací *TP53*), s celkovým přežíváním 52 měsíců.

V rámci této skupiny byly také identifikovány další tři podskupiny:

- a) především muži s CK současně s mutací *TP53* nebo izolovanou mutací *TP53*, OS 31 měsíců;
- b) ženy s izolovanou mutací *TP53*, s OS 119 měsíců;
- c) především ženy s CK a současně mutací *TP53*, OS 71 měsíců.

Největší rozdíl mezi OS ve studovaných podskupinách byl pozorován v prvních 36 měsících s nejkratším OS u P-I, úmrtí v P-I dosáhlo 25 % pacientů v prvních 12 měsících po stanovení diagnózy s vzestupem na 40 % po 36 měsících. Skupina pacientů P-IIIb (ženy s izolovanou *TP53* mutací) měli lepší OS než pacienti ve skupině P-IIIc (ženy s *TP53* mutací + CK) a P-IIIa (muži s *TP53* bez ohledu na přítomnost CK). Pacienti ve skupinách P-IIIa a P-IIIc zmrli do 3 let od stanovení diagnózy.

Pacienti s indikací léčby do 3 měsíců od stanovení diagnózy měli kratší OS (48 měsíce) než pacienti s pozdější indikací (OS 84 měsíců), $p=0,037$. Přidání rituximabu nezlepšilo přežívání pacientů v žádné z uvedených podskupin, nicméně pozorovali jsme rozdíly v odpovědi na fludarabin. V P-I skupině bylo 29 % pacientů refrakterních na fludarabin, ve skupině P-II 40 % a v P-III skupině dokonce 83 %. Fludarabin-refrakterní pacienti měli horší přežívání (OS 58 měsíců) ve srovnání s pacienty fludarabin-senzitivními (OS 101 měsíců), $p=0,003$.

Díky této studii byly identifikovány 3 hlavní podskupiny pacientů s rozdílnou prognózou a celkovým přežíváním v případě léčby standardní chemoimunoterapií. Nejrizikovějšími skupinami byly podskupiny P-IIIa (muži s CK a současnou, popř. izolovanou delecí/mutací *TP53*) a P-IIIc (ženy s CK a současnou delecí/mutací *TP53*). Další riziková skupina pacientů byla skupina P-I s CK a současnou delecí *ATM*. Identifikace těchto podskupin by tak mohla pomoci při rozhodování o léčbě a zvážení indikace nových léčebných modalit, jakými jsou inhibitory BCR signalizace.

Můj podíl práce:

U většiny pacientů jsem prováděla molekulárně-cytogenetické vyšetření, hodnocení cytogenetických výsledků a určila tak pacienty v celkovém souboru této studie.

4.4.2 Biological and clinical characteristics of patients with chronic lymphocytic leukemia with the *IGHV3-21* and *IGHV1-69*; analysis of data from a single center

Urbanova, R., L. Humplikova, H. Drimalova, V. Prochazka, P. Turcsanyi, Z. Pikalova, M. Holzerova, L. Kruzova, M. Jarosova, J. Urban, J. Vrbkova, K. Indrak, and T. Papajik. 2015. Neoplasma 62 (4):618-626. Viz Příloha č. 4.

Jedním z významných prognostických faktorů jsou mutační stavy *IGHV* a subsety stereotypních receptorů. Cílem této retrospektivní práce bylo analyzovat prognostické faktory, jakými jsou sérové markery, výsledky cytogenetického, molekulárně biologického a imunofenotypizačního vyšetření ve vztahu k celkovému přežívání pacientů. U pacientů s exprimovanými subgeny *IGHV3-21* (částečně se subsetem #2 stereotypního BCR) a *IGHV1-69* jsme posuzovali jejich prognostický význam.

V celkovém souboru se nacházelo 417 pacientů (270 mužů a 147 žen) s mediánem věku při diagnóze 61 let (v rozmezí 27–87 let). Mutační stav *IGHV* byl vyšetřen u všech pacientů, nejčastěji byla zastoupena VH3 rodina a VH1 rodina. V celkovém souboru pacientů pak bylo 7 % pacientů se subgenem *IGHV3-21* a 12 % se subgenem *IGHV1-69*. Subgen *IGHV3-21* byl v 55 % případů mutovaný, nicméně *IGHV1-69* téměř výhradně nemutován.

V multivariantní analýze byly pro OS jako statisticky významné věk (> 65 let), nemutovaný stav *IGHV*, delece 17p a počet lymfocytů (> 50 x 10⁹/l). U pacientů ve stádiu Binet A pak byla významná i přítomnost subgeny *IGHV3-21*. Univariantní analýzou nebyl prokázán rozdíl v OS u pacientů s nebo bez subgeny *IGHV3-21*, nebyl však ani prokázán rozdíl v OS u pacientů se subgenem *IGHV3-21* s ohledem na jeho mutační stav ani mezi pacienty se subgenem *IGHV3-21* a subgenem *IGHV1-69*. V univariantní analýze však byl subgen *IGHV1-69* identifikován jako statisticky významný pro OS. U pacientů se subgenem *IGHV3-21* hrají roli další prognostické faktory jako věk (> 65 let), počet lymfocytů (> 50 x 10⁹/l), hraničně i hladina sTK (sérové thymidin kinázy; > 9 U/l). Význam hladiny β2M a delecí 11q a 17p nebylo možné spolehlivě určit.

Medián doby do progresu (PFS, progression free survival) byl u pacientů se subgenem *IGHV3-21* i *IGHV1-69* 9 měsíců. U pacientů se subgenem *IGHV3-21* a zároveň subsetem #2 stereotypního BCR v porovnání s pacienty se subgenem *IGHV3-21* bez stereotypního receptoru rozdíl v PFS ani OS prokázán nebyl. U pacientů se stereotypním BCR (subset #2 *IGHV3-21*) bylo prokázáno vyšší zastoupení delece 13q a 11q, žádný z pacientů neměl delecí 17p. Vyšší procento pacientů s delecí 11q bylo prokázáno i u pacientů se subgenem *IGHV1-69*. Delece oblastí 11q a 17p korelovaly s nemutovaným *IGHV* a nevyskytovaly se společně.

Pacienti s delecí 11q a subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69* měli nejvyšší hodnoty mediánu počtu lymfocytů, u pacientů s delecí 17p byly tyto hodnoty naopak nízké. Pacienti s delecí 17p měli také vysoké hladiny β 2M a sTK, nízké počty trombocytů a hladinu hemoglobinu, která byla nižší i u pacientů se subgenem *IGHV3-21*. U pacientů s nemutovaným *IGHV* a subgeny *IGHV3-21* byly prokázány vyšší hladiny β 2M a také sTK.

Na základě této studie byl prokázán význam jednotlivých prognostických faktorů (věku, počtu lymfocytů, klinického stádia onemocnění dle Bineta, hladin β 2M a sTK, mutačního stavu *IGHV* a delecí oblastí 11q a 17p). Byla prokázána negativní prognóza pro pacienty s přítomností subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69*. S ohledem na tyto výsledky byla na našem pracovišti aktualizována doporučení vyšetřování jednotlivých ukazatelů.

Můj podíl práce:

Prováděla jsem část cytogenetických a molekulárně-cytogenetických analýz, v té době ještě jako studentka magisterského studia na HOK FNOL a LF UP v Olomouci.

5. ZÁVĚR

Chronická lymfocytární leukémie je nejčastější hematologickou malignitou u starších pacientů a má značně heterogenní klinický průběh. Důležitou roli hrají cytogenetické aberace, které detekujeme až u 82 % pacientů a které mají také velký význam nejen z hlediska určování prognózy, ale v dnešní době také z hlediska volby léčebné strategie. Kromě všeobecně uznávaných prognosticky významných rekurentních aberací vyšetřovaných u všech CLL pacientů, jakými jsou delece oblastí 13q, 11q, 17p a trizomie chromozomu 12, existuje celá řada dalších změn, se kterými se v rutinní praxi cytogenetické laboratoře u těchto pacientů setkáváme. V rámci této práce jsme se zaměřili na bližší analýzu několika těchto změn, konkrétně na význam komplexních karyotypů, delecí v oblasti 6q a zmnožení v oblasti 2p.

Komplexní karyotyp (CK) jsme v našem souboru detekovali u 79 neléčených pacientů (12,3 %) a prokázali jsme i jeho negativní prognostický význam. V rámci komplexního karyotypu byly nejčastějšími aberacemi delece oblastí 13q, 11q, 17p, duplikace 2p, 8q a delece 6q. Pacienti s aberacemi genů *ATM* a *TP53* měli horší prognózu ve srovnání s pacienty bez těchto abnormalit, nicméně v rámci pacientů s CK již tyto aberace význam z hlediska OS neměly. Neprokázali jsme ani význam počtu aberací zahrnutých v CK, které jsou v recentních studiích diskutovány. Překvapivě jsme pozorovali větší zhoršení v přežívání u žen s CK než u mužů, nicméně tento rozdíl v OS nebyl prokázán jako statisticky významný. U žen bylo prokázáno vyšší zastoupení aberací genu *TP53*, které by toto zajímavé pozorování mohlo vysvětlit.

Delecí v oblasti dlouhých ramen chromozomu 6 jsme prokázali u 7,8 % pacientů. Pozorovali jsme horší přežívání u těchto pacientů, srovnatelné s pacienty s delecemi *ATM*. Většinou byly součástí karyotypu i další chromozomové aberace (nejčastěji delece 13q, 17p a 11q) a 56 % pacientů mělo dokonce komplexní karyotyp. Pomocí arrayCGH jsme určili minimální deletovanou oblast v pruhu 6q21 o velikosti 1,1 Mb a nižší expresi několika genů (*SOBP*, *SCML4*, *SNX3*, *LACE1* a *FOXO3*). Gen *FOXO3* je tumor-supresorový gen kódující transkripční faktor negativně regulující buněčný cyklus a indukující buněčnou smrt. Pacienti s nízkou expresí *FOXO3* měli ve srovnání s pacienty s vysokou expresí *FOXO3* kratší celkové přežívání.

Zmnožení krátkých ramen chromozomu 2 bylo prokázáno u 8,6 % pacientů a korelovalo s výskytem nemutovaného *IGHV*. U většiny pacientů docházelo ke

zmnožení celých krátkých ramen chromozomu 2, které bylo často součástí komplexních karyotypů s nejčastějšími přídatnými změnami: delece 13q, 11q, duplikace 8q, delece 17p a 6q. Součástí komplexních karyotypů byly nebalancované translokace, dicentrické chromozomy a také jumping translokace, které bývají asociovány s agresivním průběhem onemocnění a špatnou prognózou. Celkové přežívání pacientů se zmnožením 2p bylo výrazně horší ve srovnání s pacienty bez této aberace. Také bylo OS výrazně kratší u pacientů se ziskem 2p již v době diagnózy. V době diagnózy bylo zmnožení 2p prokázáno u většiny pacientů.

Výsledky této práce tedy prokázaly negativní prognostický význam jak komplexních karyotypů, tak i delecí dlouhých ramen chromozomu 6 a zmnožení krátkých ramen chromozomu 2, které bývají často součástí právě komplexních karyotypů. Tím také potvrzují význam cytogenetického i molekulárně-cytogenetického vyšetření v současné rutinní diagnostické a léčebné praxi. Nezbytnou podmínkou kvalitního cytogenetického vyšetření je získání dělících se nádorových buněk vhodných ke karyotypování. I když se kultivace patologických B-lymfocytů u pacientů s CLL v posledních letech velmi zlepšila, stále u malé části pacientů není úspěšná. Vzhledem k prognostickému významu výše uvedených změn by tedy bylo vhodné zařazení dalších sond do klasického CLL panelu vyšetřovaného metodou interfázní FISH, která není závislá na počtu a kvalitě dělících se buněk, popřípadě by nebalancované genomické změny mohly být sledovány metodou arrayCGH. To by zároveň s rozšířením spektra sledovaných markerů o mutace v kandidátních genech sekvenačními technikami mohlo do budoucna vést ke zlepšení prognostické stratifikace pacientů s CLL. Tato rozšířená prognostická stratifikace by ve svém důsledku dále mohla ovlivnit výběr vhodné individuální léčebné strategie, a potenciálně by tak mohla zlepšit osud pacientů s tímto onemocněním.

Seznam použitých zkratek

A	adenin
AID	activation-induced cytidine deaminase
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APRIL	a proliferaion-inducing ligand
arrayCGH	array komparativní genomická hybridizace
A-T	ataxia telangiectasia
<i>ATM</i>	ataxia telangiectasia mutated
BAFF	B-cell activating faktor
<i>BCL2</i>	B-cell leukemia/lymphoma 2
<i>BCL3</i>	B-cell CLL/lymphoma 3
<i>BCL6</i>	B-cell lymphoma 6
<i>BCL11A</i>	B-cell leukemia/lymphoma 11A
BCR	B-cell receptor; B-buněčný receptor
<i>BIRC3</i>	baculoviral IAP repeat-containing 3
BLNK	B-cell linker protein
BM	médium bone marrow medium; médium pro kostní dřeň
B-NHL	B-nonhodgkin lymphoma; B-buněčný nonhodgkinský lymfom
bp	base pair - páry bazí (kbp - kilobáze, Mbp - megabáze)
BR	bendamustin + rituximab
BTK	Brutonova kináza
C	cytosin
CCD	kamera charge-coupled device camera; kamera s technologií snímání obrazu
<i>CCND1</i>	cyklin D1 (<i>BCL1</i> ; B -cell leukemia/lymphoma 1)
<i>CCND3</i>	cyklin D3
CD	cluster of differentiation; diferenciační antigen
CDK6	cyklin-dependentní kináza 6
<i>CDKN2A</i>	cyklin-dependentní kináza 2A (p16)
<i>CDKN2B</i>	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2B (p15)
CDR	common deleted region; často deletovaná oblast

CE	clonal evolution; klonální evoluce
CEP	centromerická sonda
CGH	komparativní genomová hybridizace
CK	complex karyotype; komplexní karyotyp
CLL	chronická lymfocytární leukémie
cp	composite karyotype
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
del	delece
der	derivovaný chromozom
dic	dicentrický chromozom
DLBCL	difuzní velkobuněčný B-lymfom
<i>DLEU1/2</i>	deleted in leukemia 1/2
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dup	duplikace
DSBs	double strand breaks
EBSS	Earle's balanced salt solution; Earlův oplachovací roztok
EBV	Epstein-Baar virus
ERIC	European Research Initiative on Chronic lymphocytic leukemia
ERK	MEK-extracellular signal-regulated kinase
FCR	fludarabin + cyklofosamid + rituximab
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<i>FOXO</i>	forkhead box O
G	guanin
Hb	hemoglobin
HL	Hodgkinův lymfom
HSCs	Hematopoetic Stem Cells - hematopoetické kmenové buňky
i	izochromozom
idem	označení pro přítomnost změn původního klonu v subklonech
iFISH	interfázní FISH
IL2/4	interleukin 2/4
<i>in situ</i>	„na místě“

ITAM	immunoreceptor tyrosin-based activation motif
<i>in vitro</i>	„ve zkumavce“
inc	incomplete; nekompletní
ins	inzerce
inv	inverze
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
ISCN	International systém for human nomenclature
iwCLL	international workshop on CLL
kD	kiloDalton
K24	kultivace 24 hodin
KD	kostní dřev
LDT	lymphocyte doubling time; zdvojovací čas lymfocytů
LSI	lokus-specifická sonda
M	muž
mar	marker
MCL	mantle cell lymphom - lymfom z buněk plášťové zóny
MDR	minimal deleted region
MDS	myelodysplastický syndrom
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MAP2K7)
M-FISH	multicolor FISH; mnohobarevná FISH
mRNA	mediátorová RNA
miRNA	micro RNA
MU	mutovaný status <i>IGHV</i>
N	normální nález
ND	not done (neprovedeno)
NGS	next generation sequencing; sekvenování nové generace
NK	normální karyotyp
NK-buňky	natural killer buňky
OS	overall survival; celkové přežívání
p	krátké rameno chromozomu
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PK	periferní krev
PLCY2	fosfolipáza CY2

pter	telomera krátkého ramene
q	dlouhé rameno chromozomu
qter	telomera dlouhého ramene
r	ring chromozom
<i>RB1</i>	retinoblastoma 1
RCD	rituximab + cyklofosfamid + dexametazon
RNA	ribonukleová kyselina
ROR1	receptor tyrosin kinase-like orphan receptor 1
rpm	rounds per minute; otáčky za minutu
RT	room temperature; pokojová teplota
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RS	Richterův syndrom
sβ2M	sérový β2-mikroglobulin
SG	spectrum green; zelené spektrum
SHIP1	Src homology 2 (SH2)-containing inositol 5-phosphatase
SNP	single nucleotide polymorphism; jednonukleotidový polymorfismus
SO	spectrum orange; oranžové spektrum
SYK	spleen tyrosin kinase
T	thymin
t	translokace
ter	telomera
TK	thymidin kináza
TNF/TNFα	tumor necrosis factor/tumor necrosis factor α
trp	triplikace
TTFT	time to first treatment; doba do první léčby
UNM	nemutovaný status <i>IGHV</i>
UNS	unsuccesful (neúspěšné)
WCP	celochromozomová sonda
WHO	World Health Organization – Světová zdravotnická organizace

Literatura

1. Rodak, R. and E. Ramseier, *[Bilateral axillary nodes. 30-year-old patient, housewife]*. Praxis (Bern 1994), 2007. **96**(46): p. 1825-8.
2. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
3. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity*. Nat Immunol, 2002. **3**(4): p. 323-8.
4. Strasser, A., A. Rolink, and F. Melchers, *One synchronous wave of B cell development in mouse fetal liver changes at day 16 of gestation from dependence to independence of a stromal cell environment*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 1973-86.
5. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 804-15.
6. Sant, M., et al., *Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3724-34.
7. Adam Z., K.M., Vorlicek J., *Hematologie - Přehled maligních hematologických nemocí*. 2008(2): p. 404.
8. Hernandez, J.A., K.J. Land, and R.W. McKenna, *Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms*. Cancer, 1995. **75**(1 Suppl): p. 381-94.
9. Smith, A., et al., *Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network*. Br J Cancer, 2011. **105**(11): p. 1684-92.
10. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. **343**(26): p. 1910-6.
11. Mauro, F.R., et al., *Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases*. Blood, 1999. **94**(2): p. 448-54.
12. Cheson, B.D., et al., *National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment*. Blood, 1996. **87**(12): p. 4990-7.
13. Montserrat, E., et al., *Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance*. Br J Haematol, 1986. **62**(3): p. 567-75.
14. Hallek, M., I. Kuhn-Hallek, and B. Emmerich, *Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 2**: p. S4-13.
15. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. **46**(2): p. 219-34.
16. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. Cancer, 1981. **48**(1): p. 198-206.
17. Malavasi, F., et al., *Human CD38: a glycoprotein in search of a function*. Immunol Today, 1994. **15**(3): p. 95-7.
18. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1840-7.
19. Krober, A., et al., *V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1410-6.
20. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
21. Jain, P., et al., *The absolute percent deviation of IGHV mutation rather than a 98% cut-off predicts survival of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab*. Br J Haematol, 2018. **180**(1): p. 33-40.

22. Stamatopoulos, K., et al., *Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations*. *Blood*, 2007. **109**(1): p. 259-70.
23. Maura, F., et al., *Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e24313.
24. Tobin, G., et al., *Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2002. **99**(6): p. 2262-4.
25. Jaramillo, S., et al., *Prognostic impact of prevalent chronic lymphocytic leukemia stereotyped subsets: analysis within prospective clinical trials of the German CLL Study Group (GCLLSG)*. *Haematologica*, 2019.
26. Monroe, J.G., *ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(4): p. 283-94.
27. Seda, V. and M. Mraz, *B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells*. *Eur J Haematol*, 2015. **94**(3): p. 193-205.
28. Kipps, T.J., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 16096.
29. Duhren-von Minden, M., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling*. *Nature*, 2012. **489**(7415): p. 309-12.
30. O'Neill, S.K., et al., *Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy*. *Immunity*, 2011. **35**(5): p. 746-56.
31. Goodnow, C.C., et al., *Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice*. *Nature*, 1988. **334**(6184): p. 676-82.
32. Nemazee, D.A. and K. Burki, *Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes*. *Nature*, 1989. **337**(6207): p. 562-6.
33. Gay, D., et al., *Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance*. *J Exp Med*, 1993. **177**(4): p. 999-1008.
34. Tiegs, S.L., D.M. Russell, and D. Nemazee, *Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells*. *J Exp Med*, 1993. **177**(4): p. 1009-20.
35. Endo, T., et al., *BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway*. *Blood*, 2007. **109**(2): p. 703-10.
36. Ghia, P., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(5): p. 1403-13.
37. Aguilar-Hernandez, M.M., et al., *IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells*. *Blood*, 2016. **127**(24): p. 3015-25.
38. Burger, J.A., et al., *The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies*. *Blood*, 2009. **114**(16): p. 3367-75.
39. Burger, J.A., M. Burger, and T.J. Kipps, *Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells*. *Blood*, 1999. **94**(11): p. 3658-67.
40. Burger, J.A., et al., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1*. *Blood*, 2000. **96**(8): p. 2655-63.
41. Pavlasova, G., et al., *Ibrutinib inhibits CD20 upregulation on CLL B cells mediated by the CXCR4/SDF-1 axis*. *Blood*, 2016. **128**(12): p. 1609-13.
42. Witze, E.S., et al., *Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors*. *Science*, 2008. **320**(5874): p. 365-9.

43. Yu, J., et al., *Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation*. J Clin Invest, 2016. **126**(2): p. 585-98.
44. Yu, J., et al., *Wnt5a induces ROR1 to associate with 14-3-3zeta for enhanced chemotaxis and proliferation of chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia, 2017. **31**(12): p. 2608-2614.
45. Hasan, M.K., et al., *Wnt5a induces ROR1 to recruit DOCK2 to activate Rac1/2 in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2018. **132**(2): p. 170-178.
46. Juliusson, G. and G. Gahrton, *Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications*. Cancer Genet Cytogenet, 1990. **45**(2): p. 143-60.
47. Juliusson, G. and M. Merup, *Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia*. Semin Oncol, 1998. **25**(1): p. 19-26.
48. Dicker, F., et al., *Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3152-60.
49. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
50. Papajik T., J.M., Plachy R., Indrak K., *Chronická B-lymfocytární leukemie; Část I: Pohled na původ, biologie a genetické u leukemických buněk* Transfuze a hematologie dnes, 2006. **2**: p. 9.
51. Mayr, C., et al., *Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2006. **107**(2): p. 742-51.
52. Brieghel, C., et al., *Deep targeted sequencing of TP53 in chronic lymphocytic leukemia: clinical impact at diagnosis and at time of treatment*. Haematologica, 2019. **104**(4): p. 789-796.
53. Zenz, T., et al., *Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3322-9.
54. Dicker, F., et al., *The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 117-24.
55. Zainuddin, N., et al., *TP53 mutations predict for poor survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma of germinal center subtype*. Leuk Res, 2009. **33**(1): p. 60-6.
56. Delgado, J., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results*. Br J Haematol, 2012. **157**(1): p. 67-74.
57. Fabris, S., et al., *Molecular and transcriptional characterization of 17p loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2008. **47**(9): p. 781-93.
58. Landau, D.A., et al., *Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia*. Cell, 2013. **152**(4): p. 714-26.
59. Nadeu, F., et al., *Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1 and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2016.
60. Nadeu, F., et al., *Clinical impact of the subclonal architecture and mutational complexity in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2018. **32**(3): p. 645-653.
61. Van Dyke, D.L., et al., *The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience*. Br J Haematol, 2016. **173**(1): p. 105-13.
62. Yu, L., et al., *Survival of Del17p CLL Depends on Genomic Complexity and Somatic Mutation*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(3): p. 735-745.
63. Malcikova, J., et al., *ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation*. Leukemia, 2018. **32**(5): p. 1070-1080.

64. Savitsky, K., et al., *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase*. *Science*, 1995. **268**(5218): p. 1749-53.
65. Savitsky, K., et al., *The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species*. *Hum Mol Genet*, 1995. **4**(11): p. 2025-32.
66. Taylor, A.M., et al., *Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia*. *Blood*, 1996. **87**(2): p. 423-38.
67. Stilgenbauer, S., et al., *Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia*. *Nat Med*, 1997. **3**(10): p. 1155-9.
68. Schaffner, C., et al., *Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1999. **94**(2): p. 748-53.
69. Shiloh, Y., *Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart*. *Annu Rev Genet*, 1997. **31**: p. 635-62.
70. Austen, B., et al., *Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(34): p. 5448-57.
71. Jain, P., et al., *High fluorescence in situ hybridization percentage of deletion 11q in patients with chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of adverse outcome*. *Am J Hematol*, 2015. **90**(6): p. 471-7.
72. Marasca, R., et al., *Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone*. *Hematol Oncol*, 2013. **31**(2): p. 88-95.
73. Kipps, T.J., et al., *Long-Term Studies Assessing Outcomes of Ibrutinib Therapy in Patients With Del(11q) Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2019. **19**(11): p. 715-722 e6.
74. Rose-Zerilli, M.J., et al., *ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial*. *Haematologica*, 2014. **99**(4): p. 736-42.
75. Rossi, D., et al., *Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2012. **119**(12): p. 2854-62.
76. Ouillette, P., et al., *Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14*. *Cancer Res*, 2008. **68**(4): p. 1012-21.
77. Ouillette, P., et al., *The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(21): p. 6778-90.
78. Puiggros, A., et al., *Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion*. *Br J Haematol*, 2013. **163**(1): p. 47-54.
79. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
80. Calin, G.A., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(17): p. 1793-801.
81. Klein, U., et al., *The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 28-40.
82. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(10): p. 704-14.
83. Sanchez-Beato, M., A. Sanchez-Aguilera, and M.A. Piris, *Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1220-35.
84. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(39): p. 13944-9.

85. Degheidy, H.A., et al., *Bcl-2 level as a biomarker for 13q14 deletion in CLL*. Cytometry B Clin Cytom, 2013. **84**(4): p. 237-47.
86. Lin, K., et al., *Loss of MIR15A and MIR16-1 at 13q14 is associated with increased TP53 mRNA, de-repression of BCL2 and adverse outcome in chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2014. **167**(3): p. 346-55.
87. Hernandez-Sanchez, M., et al., *MiRNA expression profile of chronic lymphocytic leukemia patients with 13q deletion*. Leuk Res, 2016. **46**: p. 30-6.
88. Rodriguez, A.E., et al., *Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48485.
89. Dal Bo, M., et al., *13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2011. **50**(8): p. 633-43.
90. Delgado, J., et al., *The use of tetradecanoylphorbol acetate-stimulated peripheral blood cells enhances the prognostic value of interphase fluorescence in situ hybridization in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(4): p. 327-32.
91. Hernandez, J.A., et al., *A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia*. Haematologica, 2009. **94**(3): p. 364-71.
92. Van Dyke, D.L., et al., *A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2010. **148**(4): p. 544-50.
93. Parker, H., et al., *13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2011. **25**(3): p. 489-97.
94. Chinnam, M. and D.W. Goodrich, *RB1, development, and cancer*. Curr Top Dev Biol, 2011. **94**: p. 129-69.
95. Lia, M., et al., *Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines*. Blood, 2012. **119**(13): p. 2981-90.
96. Grygalewicz, B., et al., *Monoallelic and biallelic deletions of 13q14 in a group of CLL/SLL patients investigated by CGH Haematological Cancer and SNP array (8x60K)*. Mol Cytogenet, 2016. **9**: p. 1.
97. Yi, S., et al., *The prognostic significance of 13q deletions of different sizes in patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a retrospective study*. Int J Hematol, 2017. **106**(3): p. 418-425.
98. Chena, C., et al., *Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies*. Eur J Haematol, 2008. **81**(2): p. 94-9.
99. Humplikova, L., et al., *Expression of miR-15a and miR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2013. **157**(4): p. 284-93.
100. Garg, R., et al., *The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia*. Cancer, 2012. **118**(14): p. 3531-7.
101. Puiggros, A., et al., *Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia: different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome*. Genes Chromosomes Cancer, 2014. **53**(9): p. 788-97.
102. Matutes, E., et al., *Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL)*. Best Pract Res Clin Haematol, 2010. **23**(1): p. 3-20.
103. Haidar, M.A., et al., *Expression profile of MDM-2 proteins in chronic lymphocytic leukemia and their clinical relevance*. Am J Hematol, 1997. **54**(3): p. 189-95.

104. Ibbotson, R., et al., *Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant*. *Leukemia*, 2012. **26**(1): p. 170-2.
105. Del Giudice, I., et al., *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*, 2012. **97**(3): p. 437-41.
106. Aster, J.C., S.C. Blacklow, and W.S. Pear, *Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies*. *J Pathol*, 2011. **223**(2): p. 262-73.
107. Balatti, V., et al., *Trisomy 12 CLLs progress through NOTCH1 mutations*. *Leukemia*, 2013. **27**(3): p. 740-3.
108. Mittal, A.K., et al., *Molecular basis of aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia patients with 11q deletion and trisomy 12 chromosomal abnormalities*. *Int J Mol Med*, 2007. **20**(4): p. 461-9.
109. Angelastro, J.M., et al., *Regulated expression of ATF5 is required for the progression of neural progenitor cells to neurons*. *J Neurosci*, 2003. **23**(11): p. 4590-600.
110. Persengiev, S.P., L.R. Devireddy, and M.R. Green, *Inhibition of apoptosis by ATFx: a novel role for a member of the ATF/CREB family of mammalian bZIP transcription factors*. *Genes Dev*, 2002. **16**(14): p. 1806-14.
111. Zucchetto, A., et al., *CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism*. *Blood*, 2013. **122**(19): p. 3317-21.
112. Benedetti, D., et al., *NOTCH1 mutations are associated with high CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: link between the NOTCH1 and the NF-kappaB pathways*. *Leukemia*, 2018. **32**(3): p. 654-662.
113. Athanasiadou, A., et al., *Clinical, immunophenotypic, and molecular profiling of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia and comparison with other karyotypic subgroups defined by cytogenetic analysis*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006. **168**(2): p. 109-19.
114. Riches, J.C., et al., *Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations*. *Blood*, 2014. **123**(26): p. 4101-10.
115. Strati, P., et al., *Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015. **15**(7): p. 420-7.
116. Meyer, N. and L.Z. Penn, *Reflecting on 25 years with MYC*. *Nature Reviews Cancer*, 2008. **8**: p. 976.
117. Swerdlow, S.H., et al., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2375-90.
118. Krysov, S., et al., *Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells*. *Blood*, 2012. **119**(1): p. 170-9.
119. Huh, Y.O., et al., *MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis*. *Br J Haematol*, 2008. **142**(1): p. 36-44.
120. Li, Y., et al., *The clinical significance of 8q24/MYC rearrangement in chronic lymphocytic leukemia*. *Mod Pathol*, 2016. **29**(5): p. 444-51.
121. Put, N., et al., *Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course*. *Ann Hematol*, 2012. **91**(6): p. 863-73.
122. Blanco, G., et al., *Karyotypic complexity rather than chromosome 8 abnormalities aggravates the outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 aberrations*. *Oncotarget*, 2016. **7**(49): p. 80916-80924.

123. Chapiro, E., et al., "Double-hit" chronic lymphocytic leukemia: An aggressive subgroup with 17p deletion and 8q24 gain. *Am J Hematol*, 2018. **93**(3): p. 375-382.
124. Rossi, D., et al., *The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation*. *Blood*, 2011. **117**(12): p. 3391-401.
125. Stilgenbauer, S., et al., *Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia*, 1999. **13**(9): p. 1331-4.
126. Jarosova, M., et al., *Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients*. *Am J Hematol*, 2017. **92**(10): p. E604-E607.
127. Urbankova, H., et al., *Array-based karyotyping in chronic lymphocytic leukemia (CLL) detects new unbalanced abnormalities that escape conventional cytogenetics and CLL FISH panel*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2014. **158**(1): p. 56-64.
128. Ticchioni, M., et al., *Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a*. *Oncogene*, 2007. **26**(50): p. 7081-91.
129. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(11): p. 1978-86.
130. Cerna, K., et al., *MicroRNA miR-34a downregulates FOXP1 during DNA damage response to limit BCR signalling in chronic lymphocytic leukaemia B cells*. *Leukemia*, 2019. **33**(2): p. 403-414.
131. Musilova, K., et al., *miR-150 downregulation contributes to the high-grade transformation of follicular lymphoma by upregulating FOXP1 levels*. *Blood*, 2018. **132**(22): p. 2389-2400.
132. Finn, W.G., et al., *Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients*. *Am J Hematol*, 1998. **59**(3): p. 223-9.
133. Cuneo, A., et al., *Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis*. *Leukemia*, 2004. **18**(3): p. 476-83.
134. Van Den Neste, E., et al., *Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine*. *Leukemia*, 2007. **21**(8): p. 1715-22.
135. Haferlach, C., et al., *Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping*. *Leukemia*, 2007. **21**(12): p. 2442-51.
136. Cavazzini, F., et al., *Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis*. *Br J Haematol*, 2008. **142**(4): p. 529-37.
137. Cavazzini, F., et al., *Clonal evolution including 14q32/IGH translocations in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlations in 105 patients*. *Leuk Lymphoma*, 2012. **53**(1): p. 83-8.
138. Berkova, A., et al., *Combined molecular biological and molecular cytogenetic analysis of genomic changes in 146 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Neoplasma*, 2008. **55**(5): p. 400-8.
139. De Braekeleer, M., et al., *Jumping translocation involving 13q34 in chronic lymphocytic leukemia: report of the first case studied by fluorescent in situ hybridization*. *Leuk Lymphoma*, 2016. **57**(1): p. 223-5.
140. Kojima, K., et al., *Trisomy 12 and t(14;18) in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Int J Hematol*, 1998. **67**(2): p. 199-203.
141. Sen, F., R. Lai, and M. Albitar, *Chronic lymphocytic leukemia with t(14;18) and trisomy 12*. *Arch Pathol Lab Med*, 2002. **126**(12): p. 1543-6.

142. Huh, Y.O., et al., *The t(14;19)(q32;q13)-positive small B-cell leukaemia: a clinicopathologic and cytogenetic study of seven cases*. Br J Haematol, 2007. **136**(2): p. 220-8.
143. Lu, G., Y. Kong, and C. Yue, *Genetic and immunophenotypic profile of IGH@ rearrangement detected by fluorescence in situ hybridization in 149 cases of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 2010. **196**(1): p. 56-63.
144. Martin-Subero, J.I., et al., *A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation*. Leukemia, 2007. **21**(7): p. 1532-44.
145. Schweighofer, C.D., et al., *The B cell antigen receptor in atypical chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) demonstrates remarkable stereotypy*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2759-64.
146. Huh, Y.O., et al., *Chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) is characterized by atypical morphologic and immunophenotypic features and distinctive genetic features*. Am J Clin Pathol, 2011. **135**(5): p. 686-96.
147. Michaux, L., et al., *BCL3 rearrangement and t(14;19)(q32;q13) in lymphoproliferative disorders*. Genes Chromosomes Cancer, 1996. **15**(1): p. 38-47.
148. Ohno, H., et al., *Molecular characterization of the t(14;19)(q32;q13) translocation in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 1993. **7**(12): p. 2057-63.
149. Nguyen-Khac, F., et al., *Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia*. Am J Blood Res, 2011. **1**(1): p. 13-21.
150. Fang, H., et al., *IGH translocations in chronic lymphocytic leukemia: Clinicopathologic features and clinical outcomes*. Am J Hematol, 2019. **94**(3): p. 338-345.
151. Yin, C.C., et al., *Chronic lymphocytic leukemia With t(2;14)(p16;q32) involves the BCL11A and IgH genes and is associated with atypical morphologic features and unmutated IgVH genes*. Am J Clin Pathol, 2009. **131**(5): p. 663-70.
152. Liu, P., et al., *Bcl11a is essential for normal lymphoid development*. Nature Immunology, 2003. **4**: p. 525.
153. Satterwhite, E., et al., *The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3413-20.
154. Brizard, F., et al., *11q13 rearrangement in B cell chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 1997. **25**(5-6): p. 539-43.
155. Avet-Loiseau, H., et al., *Detection of t(11;14) using interphase molecular cytogenetics in mantle cell lymphoma and atypical chronic lymphocytic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. **23**(2): p. 175-82.
156. Wlodarska, I., et al., *Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events*. J Mol Diagn, 2007. **9**(1): p. 47-54.
157. Quintero-Rivera, F., F. Nooraie, and P.N. Rao, *Frequency of 5'IGH deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 2009. **190**(1): p. 33-9.
158. Jarosova, M., et al., *Gain of chromosome 2p in chronic lymphocytic leukemia: significant heterogeneity and a new recurrent dicentric rearrangement*. Leuk Lymphoma, 2010. **51**(2): p. 304-13.
159. Haferlach, C., et al., *In Chronic Lymphocytic Leukemia the Gain of the Short Arm of Chromosome 2 Is Highly Associated with an Unmutated IGHV status, 11q/ATM Deletion, SF3B1 Mutation and a Complex Karyotype*, in American Society of Hematology. 2016, The American Society of Hematology. p. 4379.
160. Houldsworth, J., et al., *Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1862-8.

161. Ma, M., et al., *N-myc is a key switch regulating the proliferation cycle of postnatal cerebellar granule cell progenitors*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12740.
162. Scandurra, M., et al., *Genomic profiling of Richter's syndrome: recurrent lesions and differences with de novo diffuse large B-cell lymphomas*. Hematol Oncol, 2010. **28**(2): p. 62-7.
163. Ma, D., et al., *Array comparative genomic hybridization analysis identifies recurrent gain of chromosome 2p25.3 involving the ACP1 and MYCN genes in chronic lymphocytic leukemia*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2011. **11 Suppl 1**: p. S17-24.
164. Fabris, S., et al., *Chromosome 2p gain in monoclonal B-cell lymphocytosis and in early stage chronic lymphocytic leukemia*. Am J Hematol, 2013. **88**(1): p. 24-31.
165. Brejcha, M., et al., *Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization and conventional cytogenetics after stimulation with CpG oligonucleotides and interleukin-2: a prospective analysis*. Leuk Res, 2014. **38**(2): p. 170-5.
166. Ouillette, P., et al., *Clonal evolution, genomic drivers, and effects of therapy in chronic lymphocytic leukemia*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(11): p. 2893-904.
167. Nowell, P.C., et al., *Karyotypic stability in chronic B-cell leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 1988. **33**(2): p. 155-60.
168. Fegan, C., et al., *Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease*. Leukemia, 1995. **9**(12): p. 2003-8.
169. Koski, T., et al., *Complex chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia are associated with cellular drug and irradiation resistance*. Eur J Haematol, 2000. **65**(1): p. 32-9.
170. Wierda, W., et al., *Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2005. **23**(18): p. 4070-8.
171. Loscertales, J., et al., *Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2010. **51**(6): p. 1142-3.
172. Brugat, T., et al., *Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal aberrations in resistant chronic lymphocytic leukemia cells*. Blood, 2010. **116**(2): p. 239-49.
173. Puiggros, A., et al., *Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions*. Oncotarget, 2017. **8**(33): p. 54297-54303.
174. Kruzova, L., et al., *Complex karyotype as a predictor of high-risk chronic lymphocytic leukemia: A single center experience over 12 years*. Leuk Res, 2019. **85**: p. 106218.
175. Thompson, P.A., et al., *Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens*. Cancer, 2015. **121**(20): p. 3612-21.
176. Baliakas, P., et al., *Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact*. Blood, 2019. **133**(11): p. 1205-1216.
177. Doubek M., Š.M., Pospíšilová Š., Jarošová M., Papajík T., Urbanová R., Šimkovič M., Lysák D., Brejcha M., Smolej L, *Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie (CLL) – 2018* Transfuze a Hematologie dnes, 2018. **24**: p. 13.
178. Johnson, S., et al., *Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL*. Lancet, 1996. **347**(9013): p. 1432-8.

179. Eichhorst, B., et al., *First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(7): p. 928-942.
180. Herman, S.E., et al., *Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765*. *Blood*, 2011. **117**(23): p. 6287-96.
181. Herman, S.E., et al., *Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study*. *Leukemia*, 2014. **28**(11): p. 2188-96.
182. Herman, S.E., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals*. *Blood*, 2010. **116**(12): p. 2078-88.
183. Hoellenriegel, J., et al., *The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2011. **118**(13): p. 3603-12.
184. Robertson, L.E., et al., *Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome*. *Leukemia*, 1996. **10**(3): p. 456-9.
185. Roberts, A.W., et al., *Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(4): p. 311-22.
186. Eichhorst, B., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2015. **26 Suppl 5**: p. v78-84.
187. Hallek, M., et al., *iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL*. *Blood*, 2018. **131**(25): p. 2745-2760.
188. Fischer, K., et al., *Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial*. *Blood*, 2016. **127**(2): p. 208-15.
189. Tsimberidou, A.M., et al., *Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia: the M. D. Anderson Cancer Center experience*. *Cancer*, 2006. **107**(6): p. 1294-302.
190. Rossi, D., et al., *Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome*. *Br J Haematol*, 2008. **142**(2): p. 202-15.
191. Mao, Z.R., et al., *[Clonality analysis and mutational status of IgVH gene in Hodgkin variant of Richter syndrome]*. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2008. **37**(8): p. 523-8.
192. Klener, P., et al., *Mantle cell lymphoma-variant Richter syndrome: Detailed molecular-cytogenetic and backtracking analysis reveals slow evolution of a pre-MCL clone in parallel with CLL over several years*. *Int J Cancer*, 2016. **139**(10): p. 2252-60.
193. Shahidi, H., et al., *Transformation of chronic lymphocytic leukemia to immunoblastic lymphoma (Richter's syndrome)*. *Med Pediatr Oncol*, 1997. **29**(2): p. 146-51.
194. Urbankova H., K.L., Holzerova M., Urbanova R., Turcsanyi P., Papajik T., *Chromozomové aberace a jejich role v transformaci chronické lymfocytární leukemie v éře léčby inhibitory BCR signalizace*. *Transfuzie a Hematologie dnes*, 2020. **1**: p. 11.
195. Xiao, W., et al., *Hodgkin lymphoma variant of Richter transformation: morphology, Epstein-Barr virus status, clonality, and survival analysis-with comparison to Hodgkin-like lesion*. *Hum Pathol*, 2016. **55**: p. 108-116.
196. Rossi, D., et al., *Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(13): p. 4415-22.
197. Rossi, D., et al., *Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia*, 2009. **23**(6): p. 1062-72.

198. Aydin, S., et al., *CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome?* Blood, 2008. **111**(12): p. 5646-53.
199. Rossi, D., et al., *Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome.* Br J Haematol, 2012. **158**(3): p. 426-9.
200. Fabbri, G., et al., *Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation.* J Exp Med, 2011. **208**(7): p. 1389-401.
201. Fabbri, G., et al., *Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome.* J Exp Med, 2013. **210**(11): p. 2273-88.
202. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.* Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
203. Zhang, Y., Y. Xiong, and W.G. Yarbrough, *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways.* Cell, 1998. **92**(6): p. 725-34.
204. Rossi, D., et al., *Molecular history of Richter syndrome: origin from a cell already present at the time of chronic lymphocytic leukemia diagnosis.* Int J Cancer, 2012. **130**(12): p. 3006-10.
205. Brynes, R.K., et al., *Trisomy 12 in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia.* Am J Clin Pathol, 1995. **104**(2): p. 199-203.
206. Rinaldi, A., et al., *Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia.* Br J Haematol, 2011. **154**(5): p. 590-9.
207. Chigrinova, E., et al., *Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome.* Blood, 2013. **122**(15): p. 2673-82.
208. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines.* Blood, 2008. **111**(12): p. 5446-56.
209. Buhmann, R., et al., *CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells.* Br J Haematol, 2002. **118**(4): p. 968-75.
210. Schoch, C., et al., *Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases.* Leukemia, 2002. **16**(1): p. 53-9.
211. McGowan-Jordan, J., A. Simons, and M. Schmid, eds., *ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature (2016)*. 2016, Basel, Switzerland: S. Karger, AG.
212. Juliusson, G., et al., *Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities.* N Engl J Med, 1990. **323**(11): p. 720-4.
213. Wang, D.M., et al., *Intermediate prognosis of 6q deletion in chronic lymphocytic leukemia.* Leuk Lymphoma, 2011. **52**(2): p. 230-7.
214. Baliakas, P., et al., *Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data.* Am J Hematol, 2014. **89**(3): p. 249-55.
215. Catovsky, D., J. Fooks, and S. Richards, *Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults.* Br J Haematol, 1989. **72**(2): p. 141-9.
216. International, C.L.L.I.P.I.w.g., *An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data.* Lancet Oncol, 2016. **17**(6): p. 779-790.
217. Zhang, Y., et al., *FoxO family members in cancer.* Cancer Biol Ther, 2011. **12**(4): p. 253-9.

218. Zhang, Y., et al., *A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000. **27**(1): p. 52-8.
219. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
220. Delpuech, O., et al., *Induction of Mxi1-SR alpha by FOXO3a contributes to repression of Myc-dependent gene expression*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(13): p. 4917-30.
221. Chapiro, E., et al., *Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages*. *Leuk Res*, 2010. **34**(1): p. 63-8.
222. Urbanova, R., et al., *Biological and clinical characteristics of patients with chronic lymphocytic leukemia with the IGHV3-21 and IGHV1-69; analysis of data from a single center*. *Neoplasma*, 2015. **62**(4): p. 618-26.
223. Lejeune, J., et al., *[A jumping translocation (5p;15q), (8q;15q), and (12q;15q) (author's transl)]*. *Ann Genet*, 1979. **22**(4): p. 210-3.
224. Wan, T.S., et al., *Pathogenesis of jumping translocations: a molecular cytogenetics study*. *Leuk Res*, 2004. **28**(10): p. 1075-9.
225. Sawyer, J.R., et al., *Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin*. *Blood*, 1998. **91**(5): p. 1732-41.
226. Jamet, D., et al., *Jumping translocations in multiple myeloma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005. **161**(2): p. 159-63.
227. Berger, R. and O.A. Bernard, *Jumping translocations*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007. **46**(8): p. 717-23.
228. Tanaka, K. and N. Kamada, *Segmental jumping translocation in leukemia and lymphoma with a highly complex karyotype*. *Leuk Lymphoma*, 1998. **29**(5-6): p. 563-75.
229. Padilla-Nash, H.M., et al., *Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. **30**(4): p. 349-63.
230. Bernard, M., et al., *Jumping translocation in acute leukemia of myelomonocytic lineage: a case report and review of the literature*. *Leukemia*, 2000. **14**(1): p. 119-22.
231. Manola, K.N., et al., *Jumping translocations in hematological malignancies: a cytogenetic study of five cases*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008. **187**(2): p. 85-94.
232. Najfeld, V., et al., *Jumping translocations in leukemia*. *Leukemia*, 1995. **9**(4): p. 634-9.
233. Najfeld, V., et al., *Jumping translocations of the long arms of chromosome 1 in myeloid malignancies is associated with a high risk of transformation to acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2010. **151**(3): p. 288-91.
234. Houldsworth, J., et al., *Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(4): p. 920-8.
235. Hallberg, B. and R.H. Palmer, *The role of the ALK receptor in cancer biology*. *Ann Oncol*, 2016. **27 Suppl 3**: p. iii4-iii15.

Práce související s dizertační prací

Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. Kruzova L., Schneiderova P., Holzerova M., Vatořikova M., Divoka M., Turcsanyi P., Urbanova R., Kudelka M., Radvansky M., Kriegova E., Papajik T., Urbankova H., 2019. **Complex karyotype as a predictor of high-risk chronic lymphocytic leukemia: A single center experience over 12 years.** *Leukemia Research* 85:106218 (viz Příloha č. 1); IF 2,066.
2. Turcsanyi P., Kriegova E., Kudelka M., Radvansky M., Kruzova L., Urbanova R., Schneiderova P., Urbankova H., Papajik T., 2019. **Improving risk-stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia using multivariate patient similarity networks.** *Leukemia Research* 79:60–68 (viz Příloha č. 2); IF 2,066.
3. Jarosova M., Hrubá M., Oltová A., Plevová K., Kruzova L., Kriegova E., Fillerova R., Koritakova E., Doubek M., Lysak D., Prochazka V., Mraz M., Indrak K., Papajik T., 2017. **Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients.** *American Journal of Hematology* 92 (10):E604–E607 (viz Příloha č. 3); IF 5,303.
4. Urbanova R., Humplikova L., Drimalova H., Prochazka V., Turcsanyi P., Pikalova Z., Holzerova M., Kruzova L., Jarosova M., Urban J., Vrbkova J., Indrak K., Papajik T., 2015. **Biological and clinical characteristics of patients with chronic lymphocytic leukemia with the IGHV3-21 and IGHV1-69; analysis of data from a single center.** *Neoplasma* 62 (4):618–626 (viz Příloha č. 4); IF 1,961.

Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

5. Krůzová L., Papajik T., Urbánková H., 2020. **Chromozomové změny u chronické lymfocytární leukemie, jejich prognostický a prediktivní význam.** *Transfúze a Hematologie dnes 1*: 19–28 (viz Příloha č. 5).

6. Urbánková H., Krůzová L., Holzerová M., Urbanová R., Turcsányi P., Papajík T., 2020. **Chromozomové aberace a jejich role v transformaci chronické lymfocytární leukemie v éře léčby inhibitory BCR signalizace.** *Transfuze a Hematologie dnes 1*: 30–34 (viz Příloha č. 6).

Publikovaná abstrakta

1. XXXIII. Olomoucké hematologické dny – poster
ArrayCGH analýza duplikací krátkých ramen chromozomu 2 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií
Krůzová L., Štefková B., Holzerová M., Janská R., Divoká M., Urbanová R., Turcsányi P., Papajík T., Urbánková H.
Olomouc, 26.–28. 5. 2019
2. 50. výroční cytogenetická konference – přednáška
Význam nálezu komplexních karyotypů v souvislosti s delecemi/mutacemi genu TP53 u pacientů s CLL
Krůzová L., Schneiderová, P., Holzerová, M., Vatočíková, M., Turcsányi, P., Urbanová, R., Kriegová, E., Papajík, T., Urbánková, H.
Praha, 7.–8. 9. 2017
3. American Society of Hematology (ASH) – poster
Gender, Age and TP53 Disruption in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients with Complex Karyotypes in the Era of Chemo +/- Immunotherapy[?] v
Kruzova L., Schneiderova P., Holzerova M., Vatočíkova M., Divoka M., Turcsanyi P., Urbanova R., Kudelka M., Radvansky M., Kriegova E., Papajik T., Urbankova H.
Atlanta (Georgia, USA), 9.–12. 12. 2017
4. XXXI. Olomoucké hematologické dny – přednáška
Význam nálezu komplexních karyotypů v souvislosti s delecemi/mutacemi genu TP53 u pacientů s CLL
Krůzová L., Schneiderová P., Holzerová M., Vatočíková M., Turcsányi P., Urbanová R., Kriegová E., Papajík T., Urbánková H.
Olomouc, 28.–30. 5. 2017

5. Konference vědeckých prací studentů DSP na LF UP v Olomouci – přednáška
Komplexní karyotyp u nemocných s CLL
Krůzová L.
Olomouc, 8. 9. 2015
6. Celostátní sjezd lékařské genetiky a 48. výroční cytogenetická konference – přednáška
Komplexní karyotyp u nemocných s CLL
Krůzová L., Holzerová M., Mikešová M., Dřimalová H., Urbanová R., Indrák K., Papajík T., Jarošová M.
Brno, 23.–24. 9. 2015
7. XXIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí
Komplexní karyotyp u pacientů s CLL
Krůzová L., Holzerová M., Mikešová M., Dřimalová H., Urbanová R., Indrák K., Papajík T., Jarošová M.
Olomouc, 31. 5.–2. 6. 2015
8. 10th European Cytogenetics Conference 2015 – poster
FISH and arrayCGH analysis of chromosome 13q deletions in patients with chronic lymphocytic leukemia
Kruzova L., Holzerova M., Mikesova M., Urbanova R., Indrak K., Papajik T., Jarosova M.
Strasbourg (Francie), 4.–7. 7. 2015
9. XXVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí – poster
ArrayCGH analýza delecí chromosomu 13q u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií
Krůzová L., Holzerová M., Hrubá M., Mikešová M., Urbanová R., Papajík T., Indrák K., Jarošová M.
Olomouc 1.–3. 6. 2014
10. European Hematology Association (EHA) 2014 – poster
ArrayCGH analysis of chromosome 13q deletions in patients with chronic lymphocytic leukemia
Krůzová L., Holzerová M., Hrubá M., Mikešová M., Urbanová R., Papajík T., Indrák K., Jarošová M.

Milan (Itálie), 12.–15. 6. 2014

11. Konference vědeckých prací studentů DSP na LF UP v Olomouci – přednáška
Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza nové translokace t(2;14)(p14;q32) u nemocné s chronickou lymfocytární leukémií (CLL).
Kazuistika
Krůzová L.
Olomouc, 16.–17. 12. 2013

Seznam přednášek přednesených na veřejných odborných fórech

1. Meeting mladých vědců
Molekulární cytogenetika u pacientů s hematologickými malignitami
Krůzová L.
Olomouc, 21.–22. 6. 2018
2. 47. výroční zasedání Cytogenetické sekce Čs. Biologické společnosti
Heterogenita velikosti delecí na chromosomu 13 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií hodnocená pomocí arrayCGH
Krůzová L., Holzerová M., Mikešová M., Urbanová R., Papajík T., Indrác K., Jarošová M.
Praha, 4.–5. 9. 2014
3. Plenární zasedání České skupiny pro chronickou lymfocytární leukémii (ČSCLL), sekce České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně Komplexní karyotyp u nemocných s CLL
Krůzová L., Urbanová R., Dřimalová H., Holzerová M., Mikešová M., Indrác K., Papajík T., Jarošová M.
Praha 20. 3. 2015
4. Seminář Hemato-onkologické kliniky FNOL a LF UP v Olomouci
Heterogenita delece chromosomu 13 u nemocných s CLL
Krůzová L.
Olomouc, 18. 5. 2015
5. 46. výroční konference Cytogenetické sekce Čs. Biologické společnosti s mezinárodní účastí Molekulárně-cytogenetické vyšetření komplexních změn u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Krůzová L., Holzerová M., Mičková P., Mikešová M., Kropáčková J., Prekopová I., Hanzlíková J., Urbanová R., Papajík T., Indrák K., Jarošová M.

Brno, 5.–6. 9. 2013

6. Plenární zasedání České skupiny pro chronickou lymfocytární leukémii (ČSCLL), sekce České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

Vývoj Richterova syndromu, význam molekulární cytogenetiky a arrayCGH

Krůzová L. a Urbanová R.

Praha, 21. 3. 2014

7. X. Hradecký genetický den a den hematoonkologické genetiky

Vývoj CLL do Richterova syndromu, popis případu – pohled klinika a genetika

Krůzová L., Urbanová R., Holzerová M., Poczatková H., Mikešová M., Papajík T., Indrák K., Jarošová M.

Hradec Králové, 22.–23. 5. 2014

Ostatní publikace

Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. Musilova K., Devan J., Cerna K., Seda V., Pavlasova G., Sharma S., Oppelt J., Pytlik R., Prochazka V., Prouzova Z., Trbusek M., Zlamalikova L., Liskova K., Kruzova L., Jarošova M., Mareckova A., Kornauth C., Simonitsch-Klupp I., Schiefer A. I., Merkel O., Mocikova H., Burda P., Machova Polakova K., Kren L., Mayer J., Zent C. S., Trneny M., Evans A. G., Janikova A., Mraz M., 2018. **miR-150 downregulation contributes to the high-grade transformation of follicular lymphoma by upregulating FOXP1 levels.** *Blood* 132 (22):2389–2400; IF 16,262.

Přílohy

Příloha č. 1

Kruzova, L., P. Schneiderova, M. Holzerova, M. Vatalikova, M. Divoka, P. Turcsanyi, R. Urbanova, M. Kudelka, M. Radvansky, E. Kriegova, T. Papajik, and H. Urbankova. 2019. **Complex karyotype as a predictor of high-risk chronic lymphocytic leukemia: A single center experience over 12 years.** *Leukemia Research* 85:106218; IF 2,066.

Příloha č. 2

Turcsanyi, P., E. Kriegova, M. Kudelka, M. Radvansky, L. Kruzova, R. Urbanova, P. Schneiderova, H. Urbankova, and T. Papajik. 2019. **Improving risk-stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia using multivariate patient similarity networks.** *Leukemia Research* 79:60–68; IF 2,066.

Příloha č. 3

Jarsova, M., M. Hrubá, A. Oltová, K. Plevová, L. Kruzová, E. Kriegová, R. Fillerová, E. Koritáková, M. Doubek, D. Lysák, V. Procházka, M. Mraz, K. Indrak, and T. Papajik. 2017. **Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients.** *American Journal of Hematology* 92 (10):E604–E607; IF 5,303.

Příloha č. 4

Urbanova, R., L. Humplikova, H. Drimalova, V. Prochazka, P. Turcsanyi, Z. Pikalova, M. Holzerova, L. Kruzova, M. Jarosova, J. Urban, J. Vrbkova, K. Indrak, and T. Papajik. 2015. **Biological and clinical characteristics of patients with chronic lymphocytic leukemia with the *IGHV3-21* and *IGHV1-69*; analysis of data from a single center.** *Neoplasma* 62 (4):618–626; IF 1,961.

Příloha č. 5

Krůzová L., Papajík T., Urbánková H. 2019. **Chromozomové změny u chronické lymfocytární leukemie, jejich prognostický a prediktivní význam.** *Transfuze a Hematologie dnes 1*: 19–28.

Příloha č. 6

Urbánková H., Krůzová L., Holzerová M., Urbanová R., Turcsányi P., Papajík T. 2020. **Chromozomové aberace a jejich role v transformaci chronické lymfocytární leukemie v éře léčby inhibitory BCR signalizace.** *Transfúze a Hematologie dnes 1*: 30–34.