

Univerzita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta

**Molekulárně cytogenetické studium
chromosomových změn u leukémií**

(Klinický význam cytogenetiky a molekulární
cytogenetiky u chronické myeloidní leukémie)

Disertační práce

Olomouc 2010

RNDr. Milena Holzerová

Poděkování

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně, s použitím uvedené literatury, pod vedením školitelky paní prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošové, CSc. a uvádím v ní pouze výsledky své vlastní výzkumné práce.

Práce byla podporována výzkumným projektem MŠMT č. 6198959205, grantem IGA NS9949-3 a grantem LF University Palackého v Olomouci č. 911100041.

V práci byla využita data z databáze CAMELIA.

V Olomouci 28.12.2010

RNDr. Milena Holzerová

OBSAH

1	ÚVOD.....	6
1.1	Krvetvorba	8
1.2	Poruchy krvetvorby.....	12
1.2.1	Leukémie	13
2	CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE	15
2.1	Definice.....	15
2.2	Epidemiologie a etiologie	17
2.3	Obecná charakteristika CML	18
2.4	Diagnostika CML	20
2.5	Léčba CML	22
2.6	Prognóza CML.....	24
3	CYTOGENETIKA A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKA CML.....	27
3.1	Historie objevu chromosomu Philadelphia.....	27
3.2	Variantní translokace vzniku Ph chromosomu	28
3.3	Přidatné chromosomové změny	31
3.3.1	Delece 9q	35
3.3.2	Chromosomové změny v Ph negativním klonu.....	36
3.4	Hodnocení cytogenetické odpovědi na léčbu	36
3.5	Molekulární patofyziologie CML.....	38
4	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	42
5	MATERIÁL A METODY.....	43
5.1	Soubor pacientů	43
5.2	Metody	46
5.2.1	Klasická cytogenetická analýza	46
5.2.2	Metoda fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	46
5.2.2.1	Příprava BAC sond	47
5.2.3	Metoda mnohobarevné FISH (M-FISH).....	48
5.2.4	Metoda komparativní genomové hybridizace (CGH)	48
5.2.5	Hodnocení výsledků <i>in situ</i> hybridizace.....	49
5.2.6	Metoda array komparativní genomové hybridizace (aCGH)	49
5.2.7	Metody molekulárně biologické	49
5.2.8	Detekce Ph chromosomu a přidatných chromosomových změn	50
5.2.9	Statistická analýza.....	50
6	VÝSLEDKY	51
6.1	Obecná charakteristika souboru.....	51
6.2	Výsledky cytogenetické analýzy v době diagnózy CML	51
6.2.1	Ph chromosom vzniklý standardní translokací	52
6.2.2	Variantní translokace	53
6.2.3	Přidatné chromosomové změny	55
6.2.3.1	Komplexní přestavby karyotypu.....	59
6.2.3.2	Delece 9q	62
6.2.3.3	Ztráta chromosomu Y u mužů	65

6.2.3.4	Trisomie chromosomu 8	65
6.2.3.5	Další přídavné chromosomové změny.....	65
6.3	Výsledky cytogenetické analýzy v průběhu léčby.....	65
6.3.1	Přídavné chromosomové změny u nemocných s variantní translokací ..	71
6.3.2	Komplexní přestavby	76
6.3.3	Delece 9q	78
6.3.4	Ztráta chromosomu Y	78
6.3.5	Trisomie chromosomu 8	78
6.3.6	Přídavné chromosomové změny v Ph negativním klonu	78
6.4	Hodnocení léčebné odpovědi ve skupinách podle cytogenetických nálezů	79
6.4.1	Nemocní bez vstupních cytogenetických dat.....	79
6.4.2	Nemocní pouze s Ph chromosomem.....	80
6.4.3	Variantní translokace	80
6.4.4	Komplexní přestavby	81
6.4.4.1	Komplexní přestavby zjištěné v době diagnózy CML.....	81
6.4.4.2	Komplexní přestavby zjištěné v průběhu léčby CML	82
6.4.5	Delece 9q	83
6.4.6	Ztráta chromosomu Y	83
6.4.6.1	Ztráta chromosomu Y v době diagnózy CML	83
6.4.6.2	Ztráta chromosomu Y v průběhu léčby	84
6.4.7	Trisomie chromosomu 8	84
6.4.7.1	Trisomie chromosomu 8 v době diagnózy CML	84
6.4.7.2	Trisomie chromosomu 8 v průběhu léčby	84
6.4.8	Nemocní s jinými chromosomovými změnami	85
6.5	Hodnocení léčebné odpovědi ve skupinách podle typu léčby	86
6.5.1	Imatinib v 1. linii léčby	88
6.5.2	Imatinib v 2. linii léčby	89
6.5.3	Transplantace krvetvorných buněk (TKB)	92
6.5.4	Jiný typ léčby	93
6.6	Nemocní s druhou hematologickou malignitou (kazuistiky).....	94
6.6.1	Kazuistika 1. – pacientka č. 87	95
6.6.2	Kazuistika 2. – pacient č. 213	99
6.6.3	Kazuistika 3. – pacient č. 215	100
6.6.4	Kazuistika 4. – pacient č. 147	102
6.6.5	Kazuistika 5. – pacientka č. 94	103
7	DISKUSE.....	105
8	SOUHRN	113
9	SUMMARY	116
10	PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK.....	119
11	SEZNAM LITERATURY.....	122
12	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	138

1 ÚVOD

Chronická myeloidní leukémie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění hematopoetické kmenové buňky, které tvoří přibližně 15 – 20 % všech leukémií. Je charakterizované přítomností cytogenetické změny, Philadelphia chromosomu (Philadelphia chromosome – Ph), který vzniká reciprokou translokací mezi dlouhými rameny chromosomu 9 v pruhu q34 a chromosomu 22 v pruhu q11, t(9;22)(q34;q11). Výsledkem této translokace na molekulární úrovni je vznik nového fúzního genu *BCR/ABL1*, který kóduje protein s konstitutivně zvýšenou tyrosinkinázovou aktivitou. Protein Bcr/Ab11 aktivuje řadu signálních drah, které ve svém důsledku vedou k abnormální buněčné adhezi, zvýšené proliferaci a inhibici apoptózy. Bylo prokázáno, že protein Bcr/Ab11 hraje klíčovou roli v patogenezi CML.

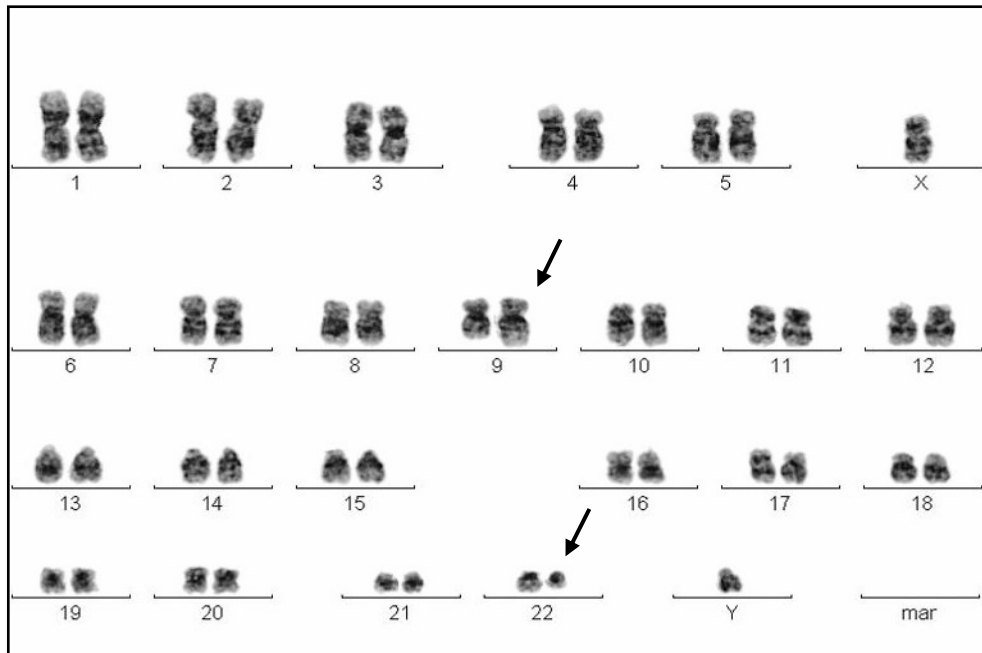
Objev Ph chromosomu a následný objev leukemického fúzního genu *BCR/ABL1* a proteinu Bcr/Ab11 během 80. let posunuly zásadním způsobem naše poznatky o etiopatogenezi CML a umožnily koncem minulého století rozvinout a zahájit realizaci revoluční koncepce cílené léčby.

CML byla skutečně prvním lidským nádorovým onemocněním, u kterého byla cytogenetická změna definována na molekulární úrovni. Pokrok v oblasti molekulárního klonování a hybridizačních technik dovolil rozvoj řady dalších tzv. molekulárně cytogenetických metod jako je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), techniky, která je dnes rutinní laboratorní metodou rychlé detekce přítomnosti Ph chromosomu a fúze genů *BCR/ABL1*. Použití této techniky hned po jejím zavedení odhalilo cytogeneticky a molekulárně geneticky neurčenou změnu na derivovaném chromosomu 9, delecii, která je cílem diagnostického vyšetření nemocných pro stále kontroverzní prognostický význam. Přesto, že se další přídatné změny k Ph chromosomu v době diagnózy CML vyskytují jen u 10 % nemocných, jejich určení je prognosticky významné a v takových případech má své nezastupitelné místo další metoda molekulární cytogenetiky, metoda mnohobarevné FISH nebo metoda komparativní genomové hybridizace (CGH).

Výsledky metod klasické cytogenetiky, molekulární cytogenetiky a molekulární genetiky byly v konečném důsledku využity pro syntézu léku pro cílenou léčbu nemocných s Ph pozitivní CML. V roce 1992 byl syntetizován účinný *ABL* kinázový inhibitor CGP57148, později označený jako STI571, imatinib mesylát (IM), u nás komerčně dostupný

pod názvem Glivec. Revoluční pokrok v léčbě CML na začátku 21. století, odstartoval nové období, označované “**érou imatinibu**“. Výsledky této cílené léčby posunuly hranice využití klasické cytogenetické analýzy, která nic neztratila na svém významu. Výsledky cytogenetiky slouží k hodnocení odpovědi na léčbu inhibitory tyrosinových kináz (TKI) a dosažení cytogenetické odpovědi je rozhodující pro další léčebné rozhodování. Vysoká účinnost léčby TKI a eradikace Ph pozitivního klonu vede u některých nemocných k objevení se fenoménu chromosomových změn v Ph negativním klonu, který může být odhalen a potvrzen právě jen klasickou cytogenetikou a metodami FISH. Role cytogenetiky zůstává zachována i v době nástupu léčby preparáty TKI druhé generace. Vyhodnocení výsledků klinických a laboratorních nálezů u nemocných s CML jsou předmětem studia všech hematologických center, která o tyto nemocné pečují. Aby bylo možné vyhodnotit jak klinická, tak laboratorní data a výsledky léčby, byla vytvořena v ČR databáze nemocných s CML, která se nazývá CAMELIA. Sdružuje celkem 10 hematologických pracovišť České a Slovenské republiky, která dobrovolně poskytují data o nemocných s CML. Tato databáze se součástí jednotné evropské sítě pracovišť, která společně analyzují výsledky těchto nemocných a domlouvají se na společné strategii léčby a laboratorních postupů. Evropská leukemická síť (European Leukemia Net - ELN), jak bylo toto uskupení nazváno, vydává doporučení pro klinické i laboratorní přístupy k diagnostice, monitorování i léčbě nemocných s CML.

Úspěšná léčba CML pomocí TKI v první linii léčby, která vede k dosažení kompletní hematologické odpovědi u 90 % nemocných a kompletní cytogenetické odpovědi u 70 % nemocných, se tak stala modelem pro další uplatnění cílené terapie i u jiných nádorů. Na podkladě všech skutečností lze říct, že základem současné úspěšné léčby nemocných s CML bylo odhalení chromosomové změny, Ph chromosomu (Obrázek 1). Studium chromosomových změn u nemocných s CML má i v 21. století stále nezastupitelný význam.



Obrázek 1: Karyotyp nemocného s CML: 46,XY,t(9;22)(q34;q11)
 (Hemato-onkologická klinika FN a LF Olomouc, 2006)

1.1 Krvetvorba

Vývoj krvetvorby (hemopoézy)

Krvetvorba je komplikovaný a dodnes ne zcela dostatečně prozkoumaný proces (Ketley a Newland, 1997), během kterého hematopoetická kmenová buňka diferencuje do mnoha buněčných typů. Základními vlastnostmi hematopoetické kmenové buňky jsou schopnost sebeobnovy a pluripotence. Sebeobnova je obecnou vlastností kmenových buněk. Pluripotence představuje široký diferenciační potenciál – hematopoetická kmenová buňka vytváří všechny buněčné populace krve po celý život organismu. Proces proliferace a diferenciaci pluripotentní kmenové buňky je ovlivněn působením růstových faktorů (hormony a cytokiny), fyzikálními interakcemi s podpůrnými stromálními buňkami a chemickou interakcí se sérovými faktory (Weissman, 2001). Krvetvorba je vývojový proces, který začíná už během 3. týdne zárodečného života (Tavian a Péault, 2005) a probíhá po celý život člověka. Po dobu vývoje lidského zárodku dochází ke změně lokalizace vzniku krvetvorby. Nejprve probíhá ve žlutkovém vaku, později v játrech, ve slezině a od 4. - 5. měsíce v kostní dřeni.

Krvetvorba v průběhu zárodečného života probíhá ve třech obdobích (Koury a Lichtman, 2010):

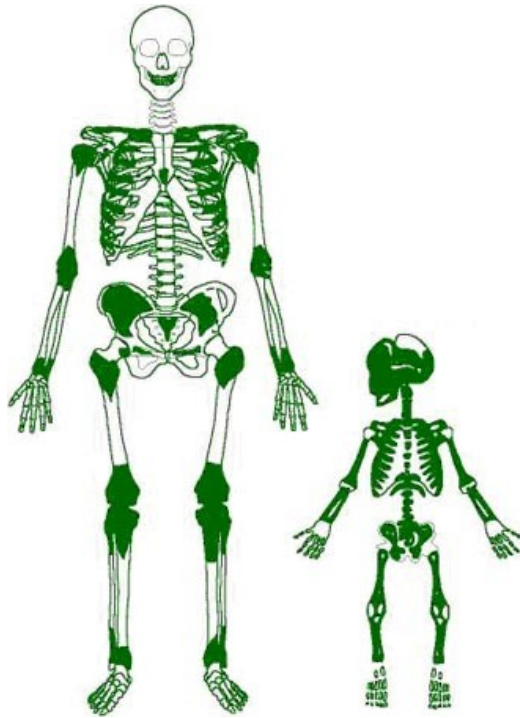
1. Mezoblastové období – ke krvetvorbě dochází v krevních ostrůvcích ve žloutkovém vaku, je pouze erytroidní povahy. Tvoří se primitivní erytroblasty s buněčným jádrem.

2. Hepatolienální období – od 2. měsíce zárodečného života probíhá hemopoéza také v játrech, v důsledku cirkulace krve mezi žloutkovým vakem a embryem. Stejně jako v předchozím období je stále převážně povahy erytroidní. Spolu s bezjadernými erytroblasty se tvoří i první druh bílých krvinek (granulocyty) a mateřské buňky krevních destiček (megakaryocyty). Játra jsou až do poloviny zárodečného života nejaktivnějším krvetvorným orgánem. Mezi 3. – 5. měsícem se na krvetvorbě podílí i slezina. Zpočátku v ní probíhá pouze krvetvorba červená, později v rámci bílé krvetvorby vznikají i lymfocyty. Na krvetvorbě lymfocytů se v tomto období na krátký čas podílí i thymus.

3. Medulární období – v 5. měsíci vývoje se vytváří ložiska krvetvorby v kostní dřeni. Současně se v lymfatických uzlinách začínají tvořit lymfocyty. S rozvíjející se tvorbou lymfocytů v lymfatických uzlinách postupně zaniká tvorba krvinek ve slezině.

Přibližně od 3. týdne po narození probíhá krvetvorba jen v kostní dřeni - rozvíjí se zde tvorba červených a většiny bílých krvinek a krevních destiček. I po narození se část lymfocytů tvoří v lymfatické tkáni sleziny, lymfatických uzlinách, thymu a lymfatických tkáních na různých místech těla.

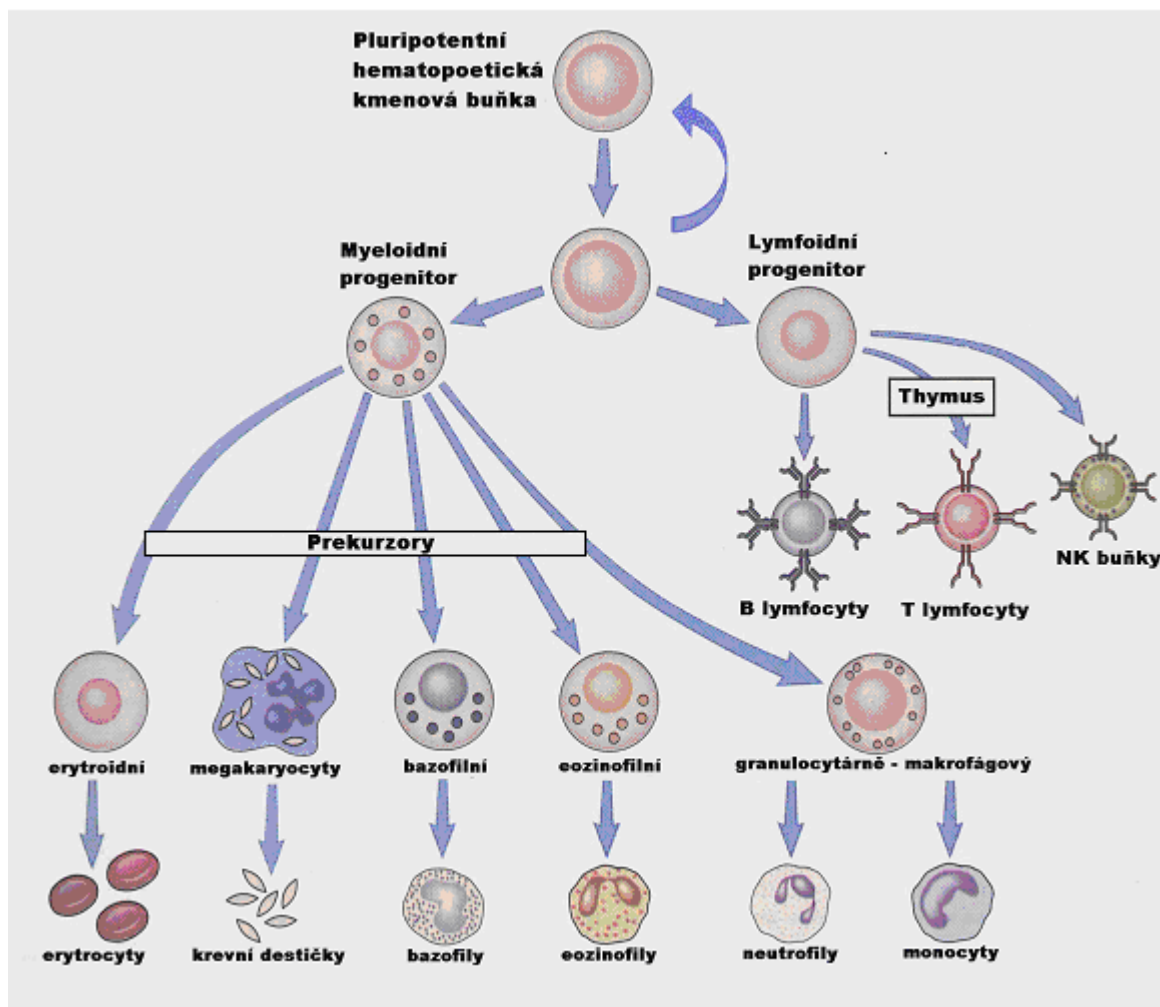
Do 5. roku života probíhá krvetvorba v kostech, později pouze v kostech krátkých a plochých, nebo také v hlavicích dlouhých kostí. V ostatních kostech je krvetvorba nahrazována neaktivní tukovou tkání. Po 18. roce života probíhá krvetvorba již jen v hrudní kosti, v žebrech, v kostech rukou, nohou, obratlích, v pánevní kosti a v lopatce (Obrázek 2). V dospělosti dochází k obnovení krvetvorby v játrech a slezině pouze za patologických stavů postihujících kostní dřev, například při leukémii a hovoříme o tzv. extramedulární hemopoéze (Koury a Lichtman, 2010).



Obrázek 2. Lokalizace krvetvorby (Převzato: www.lf3.cuni.cz/histologie)

Vývoj krevních buněk

Všechny krvinky mají původ v jedné společné pluripotentní kmenové buňce. Z pluripotentních kmenových buněk nejprve vznikají multipotentní kmenové buňky dvojího typu - lymfoidní (Common Lymphoid Progenitor, CLP) a myeloidní (Common Myeloid Progenitor, CMP). Z multipotentních kmenových buněk vznikají unipotentní (progenitorové) buňky, ze kterých se mohou dále tvořit již jen buňky určitých vývojových řad. Z CLP tak vznikají unipotentní progenitory T-lymfocytů a B-lymfocytů a z CMP se vyvíjejí multipotentní progenitory CFU-GM (Colony-Forming Unit Granulocyte-Monocyte) a unipotentní progenitory erytrocytů, megakaryocytů, basofilů a eosinofilů. Z CFU-GM se pak vyvíjejí unipotentní progenitory monocytů a neutrofilů (Obrázek 3). Do krevního oběhu jsou za fyziologického stavu uvolňovány pouze zralé erytrocyty, trombocyty, basofily, neutrofilily, eosinofily, monocyty, T-lymfocyty a B-lymfocyty.

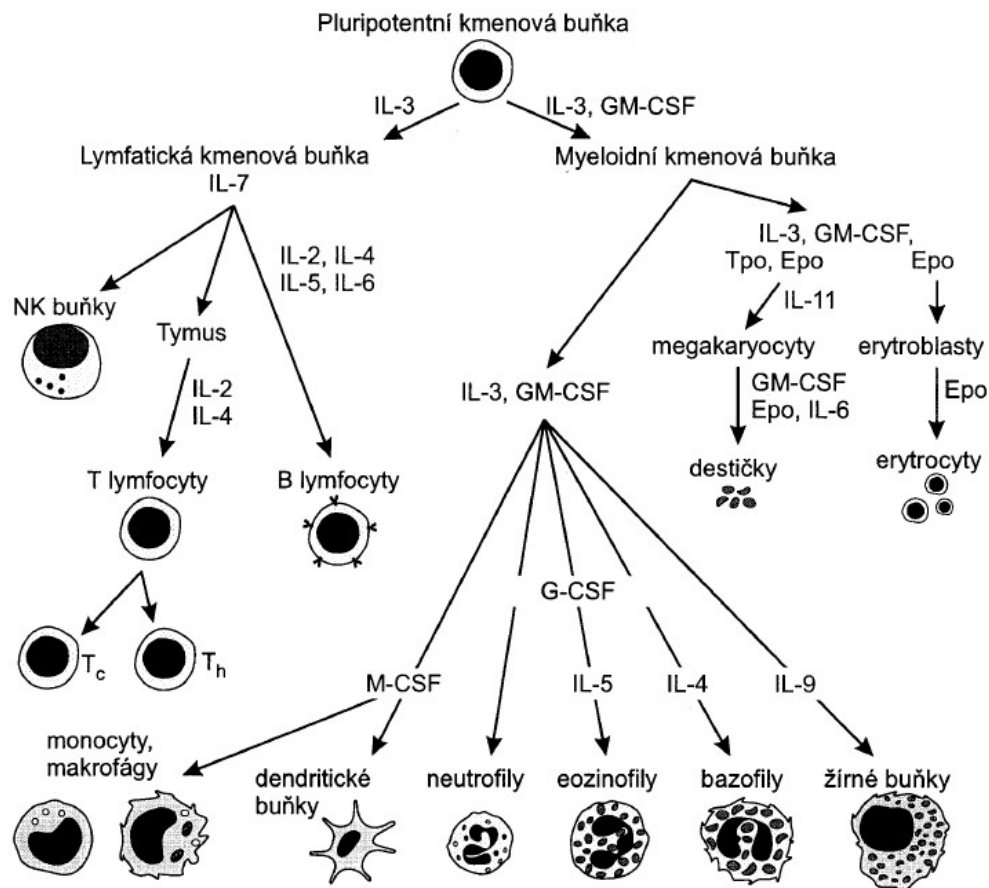


Obrázek 3: Hematopoéza (převzato z Abbas, 2000).

Řízení krvetvorby

Řízení krvetvorby je ovlivněno především cytokiny, mezi které patří interleukiny, interferony, hemopoetické růstové faktory a další regulační proteiny. V naprosté většině případů se jedná o glykoproteiny, které jsou produkovány v bílých krvinkách, stromatu kostní dřeně, endoteliích, případně i v jiných tkáních. Všechny jsou součástí regulačně-informační sítě řídící krvetvorbu, imunitní a zánětlivé reakce. Preparáty hematopoetických růstových faktorů stimulující myeloidní a erytroidní řadu (GM-CSF, G-CSF a EPO) jsou v hematologické a onkologické praxi již řadu let široce využívány, zejména pro reparaci krvetvorby po chemoterapii, po ozáření a také pro mobilizaci hematopoetických kmenových buněk a jejich transplantaci. Růstový faktor G-CSF je používán při léčbě febrilní neutropenie u nemocných např. po intenzivní a vysoko dávkované chemoterapii, EPO při léčbě chronické anemie u nemocných s onkologickým onemocněním. Působení

cytokinové sítě je natolik komplexní, že přesnou úlohu jednotlivých mediátorů lze v některých případech určit pouze zčásti (Obrázek 4). Průběh krvetvorby je ovlivňován také dostupností živin, vitaminů – B12, B6, B1 aj., minerálních látek, především železa, kobaltu, mědi, neuroendokrinními vlivy atd.



Obrázek 4: Vliv cytokinů na diferenciaci krevních buněk do jednotlivých linií (Toman, 2000)

1.2 Poruchy krvetvorby

Poruchy tvorby krve mohou nastat z mnoha různých příčin. Může jít jak o vrozená, tak získaná onemocnění, o vliv jiných probíhajících chorob, nebo vnějších faktorů. Tyto poruchy mohou postihovat všechny krevní řady, jejich jednotlivé vývojové fáze a ohrožují pacienty všech věkových skupin. Zdravotní komplikace vznikající na základě poruch krvetvorby se odvozují zejména od funkce, kterou postižené krevní elementy zastávají.

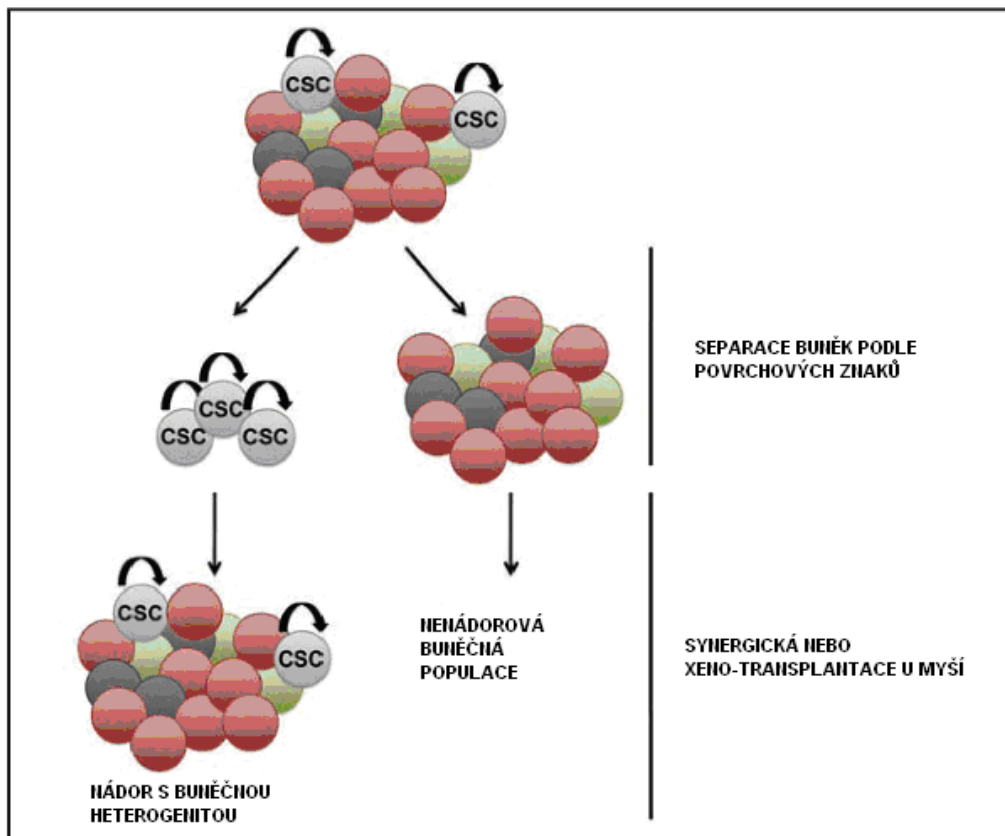
Širokou skupinu krvetvorných poruch můžeme rozdělit na **poruchy nenádorové a nádorové**. Mezi nádorové řadíme především **leukémie**.

1.2.1 Leukémie

Leukémie jsou heterogenní skupinou nádorových onemocnění krvetvorby, které vznikají maligní transformací hematopoetické kmenové buňky. Příčiny jejich vzniku nejsou dosud jednoznačně objasněny. Současná teorie vzniku nádorů předpokládá, že i při vzniku leukémie dochází ke kumulaci řady genetických změn, které vedou k abnormální proliferaci, diferenciaci a narušení procesů apoptózy.

Před více jak 10 lety byla publikována práce Johna Dicka a spolupracovníků, kteří poprvé ukázali, že leukemický potenciál většiny lidských akutních myeloidních leukémií (AML) spočívá v buněčné populaci, která nese znaky CD34+/CD38-. Když byly ozářeným imunodeficitním myším aplikovány lidské leukemické kmenové buňky CD34+/CD38-, rozvinula se u nich po čase leukémie (AML). V případě podání kmenových buněk CD34+/CD38+ k vývoji onemocnění u myši nedošlo (Bonnet a Dick, 1997).

Toto pozorování je považováno za důkaz existence leukemické kmenové buňky (Obrázek 5). Později byla pomocí laboratorních experimentů prokázána existence nádorových kmenových buněk i u řady solidních nádorů a nedávno i u CML.



Obrázek 5. Hypotéza nádorové kmenové buňky: Pouze specifická populace nádorových buněk tzv. nádorová kmenová buňka (CSC) je schopna vytvořit nádor a utvořit heterogenní populaci buněk v nádoru. Šipky označují schopnost sebeobnovy, který je výjimečnou vlastností CSC (Upraveno podle: Stuart, 2009)

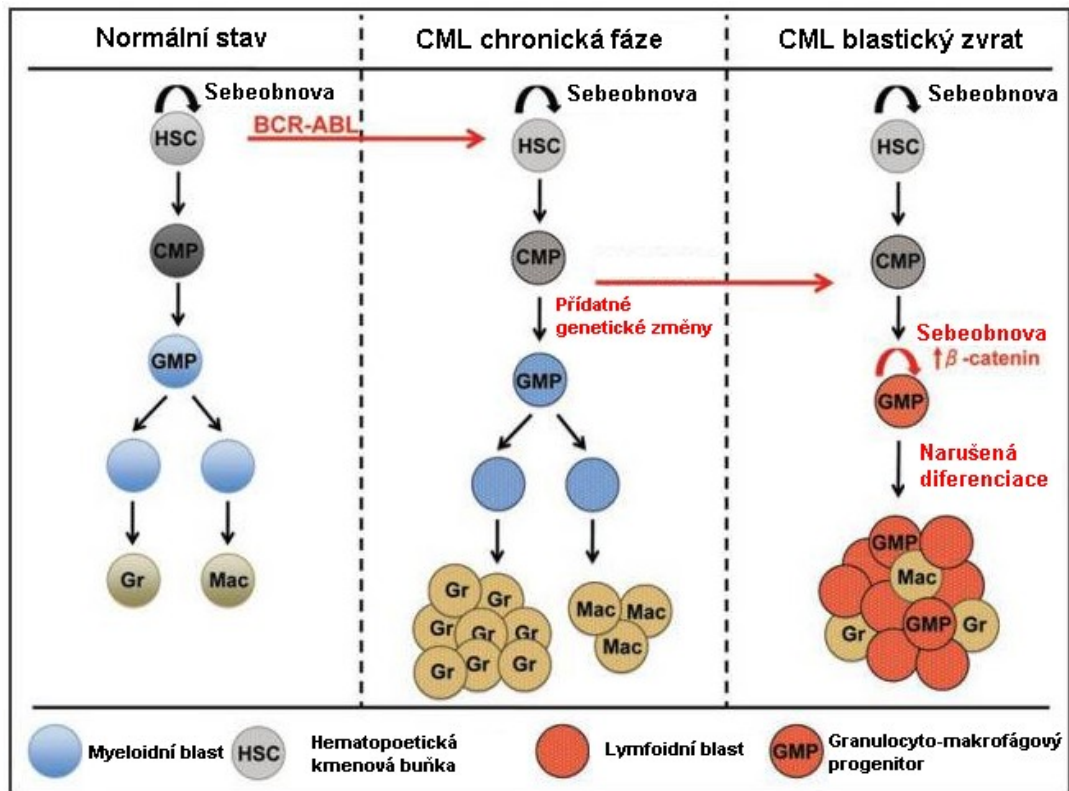
2 CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE

2.1 Definice

Chronická myeloidní leukémie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění vznikající maligní transformací hematopoetické kmenové buňky, která diferencuje převážně do myeloidní řady.

Potvrzením existence leukemické kmenové buňky u CML bylo provedeno teprve nedávno, a to na základě sledování odpovědi na léčbu u nemocných léčených inhibitory tyrosinkináz. Většina na IM senzitivních nemocných vykazuje i po létech léčby *BCR/ABL1* pozitivitu a po zastavení nebo přerušení léčby nastupuje rychlý relaps choroby (Faber, 2010 dle Cortes, 2004). Na základě těchto zkušeností se ukazuje, že v organismu perzistuje na léčbu neodpovídající populace leukemických kmenových buněk, která je schopna nové progrese do typické CML v chronické fázi. Mechanismus, který umožňuje leukemickým buňkám „vzdorovat“ účinku TKI, není zatím zcela objasněn. Současné studie považují za leukemickou kmenovou buňku v chronické fázi *BCR/ABL1* pozitivní CD34+/CD38-hematopoetickou buňku. Svědčí pro to *in vitro* analýzy CML nemocných, experimenty na myších modelech a matematické modely hierarchie hematopoézy u CML (Faber, 2010 dle Jørgensen, 2007; Stuart, 2009).

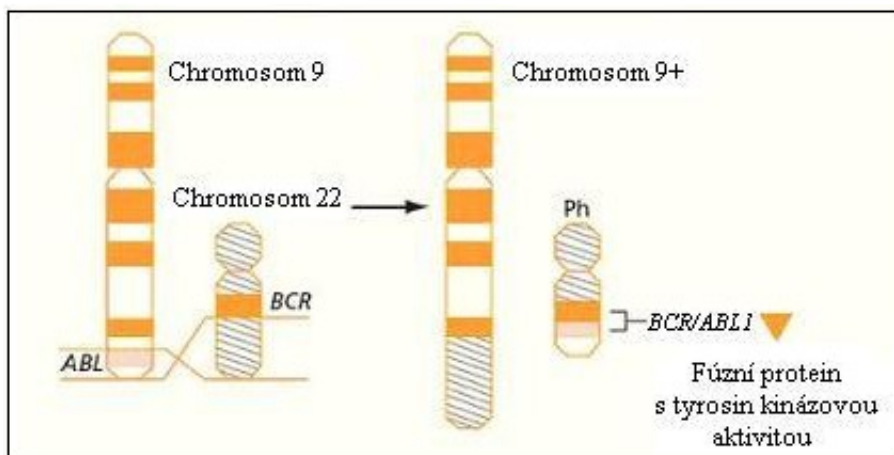
Kandidátní leukemickou kmenovou buňkou u blastické krize CML je granulocytární-makrofágový progenitor (GMP), který získá v průběhu progrese CML genetickou změnu zabezpečující sebeobnovu (Stuart, 2009) (Obrázek 6). Podle současných studií je tato získaná (patologická) schopnost sebeobnovy GMP u blastické krize CML zprostředkována aktivací Wnt/ β -kateninové signální dráhy (Minami, 2008). Mechanismus této aktivace není zcela objasněn, jednou z možností je deregulace kinázy GSK3 β , která není schopna fosforylovat β -katenin (Faber, 2010 dle Abrahamsson, 2009). Klíčovými cílovými geny β -kateninu jsou geny pro cyklin D1, c-myc a další geny, které hrají zásadní roli v přežití a sebeobnově LSC.



Obrázek 6 : Evoluce leukemické kmenové buňky (LSC) v průběhu progresu CML.

V chronické fázi CML dominuje abnormálně zvýšený počet zralých granulocytů. Hematopoetické kmenové buňky (hematopoetic stem cells, HSCs) v tomto případě zastávají funkci „leukémie iniciační“ buňky. Přechod k blastickému zvrátu je doprovázen přídatnými genetickými změnami, které vedou k akumulaci nezralých leukemických blastů. Jako „leukémie iniciační“ buňky se zde uplatňují vedle *BCR/ABL1* pozitivních HSC i GMP, které získají v progresi do blastického zvrátu schopnost sebeobnovy (Upraveno dle Faber, 2010 a Stuart, 2009).

Až 90 – 95 % nemocných má v době diagnózy CML přítomen derivovaný chromosom 22, Ph chromosom, který je výsledkem reciproké translokace distálních částí dlouhých ramen chromosomů 9 v pruhu q34 a chromosomu 22 v pruhu q11 - t(9;22)(q34;q11). Translokace vede ke vzniku fúzního genu *BCR/ABL1*, který kóduje fúzní protein Bcr/Abl1 (Obrázek 7). Přibližně u 5 % nemocných Ph chromosom nelze cytogeneticky prokázat, tito nemocní jsou však nositeli fúzního genu *BCR/ABL1* a jejich onemocnění se klinicky v ničem neodlišuje od Ph pozitivní CML.



Obrázek 7: Schéma translokace $t(9;22)(q34;q11)$ – vznik Ph chromosomu
(Převzato a upraveno podle: <http://www.epgonline.org/images/cml/2117-a.gif>)

2.2 Epidemiologie a etiologie

CML představuje 10 – 15 % všech leukémií s incidencí 1 až 2 nově diagnostikované případy na 100 000 obyvatel a rok. Postihuje muže i ženy, v poměru přibližně 1,5:1 (Berger, 2005). Objevuje se ve všech věkových kategoriích, ale její incidence narůstá s přibývajícím věkem. V dětství je choroba vzácná, představuje asi 3 % dětských leukémií a 10 % všech leukémií starších dětí a adolescentů. Nejvyšší incidence CML je kolem 60 let věku (Hehlmann, 2007). Velice vzácně byly popsány případy familiárního výskytu CML, ale nebyl nalezen obecný etiologický faktor. Většina nemocných s CML nemá žádnou historii nadměrné expozice záření nebo chemickým mutagenům. Přesto bylo potvrzeno, že incidence CML se zvyšuje se zvyšující se dávkou záření (Maloney, 1987). Po akutní nebo subakutní expozici vysokými dávkami záření následuje různě dlouhá latentní perioda 4 – 11 let, po které incidence jak AML, tak CML, narůstá lineárně vzhledem k dávce obdrženého záření. U Japonců, kteří přežili atomový výbuch, se vrchol incidence CML objevil 10 let po výbuchu a byl 50x vyšší než výskyt v neozářené populaci. Mladší nemocní (<15 let) vyvinuli leukémii dříve než starší (>30 let) nemocní. V etiologii CML je tedy jediným jednoznačně prokázaným zevním faktorem ionizující záření. Doposud se nepodařilo jednoznačně prokázat vliv chemikálií nebo virů (Clarkson, 1997).

Kromě kumulace získaných genetických změn se na vzniku leukémie mohou podílet i faktory zevního prostředí jako např. kouření, chemikálie, radioaktivní záření, předcházející léčba nádorového onemocnění. Nejsou známy vrozené, familiární, geografické, etnické nebo ekonomické spojitosti se vznikem CML. Onemocnění nelze předcházet a není dědičné (Bizzozero, 1967).

2.3 Obecná charakteristika CML

Současná diagnostika CML se opírá o výsledky krevního obrazu a cytogenetické vyšetření. Subjektivní klinické projevy onemocnění jsou nespecifické (únava, hubnutí, zvýšené pocení, subfebrilie; tzv. B-příznaky). Časté potíže pramení ze splenomegalie (bolesti pod levým žeberním obloukem nebo v levém rameni, pocit plnosti v břiše), jež se vyskytuje u více jak poloviny pacientů. Více než třetina nemocných nemá při diagnóze žádné potíže. Onemocnění je u nich zjištěno náhodně většinou při vyšetření krevního obrazu. Nejtypičtějším laboratorním projevem CML jsou výrazná leukocytóza ($> 25 \times 10^9$ buněk/l) s bazofilií nebo eosinofilií, počet trombocytů může být normální, nebo mírně snížený, ale častější jsou případy s trombocytémií. Mírná anémie se vyskytuje asi u třetiny nemocných. Klinický obraz a laboratorní hodnoty se mění v závislosti na progresi choroby. Neléčená (ale v některých případech bohužel i léčená) CML probíhá u většiny nemocných ve 3 fázích:

Chronická fáze (CF) CML – je charakterizována množstvím neutrofilních leukocytů s posunem doleva, někdy trombocytémií a mírnou splenomegalií. V této fázi mají nemocní většinou normální kvalitu života. Délka trvání CF CML se dá očekávat v rozsahu roků.

Akcelerovaná fáze (AF) CML – bývá charakterizována zvětšováním sleziny, zvyšováním podílu blastů, promyelocytů a bazofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů, anemizací a někdy i poklesem počtu trombocytů. V AF nemocní s CML přežívají většinou jen měsíce a léčba této fáze CML je méně úspěšná, než léčba nemocných v CF CML.

Blastický zvrát (BZ) CML – je terminální fází CML, neliší se laboratorním nálezem v KO či v kostní dřeni od obrazu akutní leukémie ($\geq 20\%$ blastů). Prognóza BZ CML je ale výrazně horší než prognóza *de novo* akutní myeloidní leukémie (AML) s nadějí na přežití v rozpětí týdnů až měsíců. Mírně lepší prognózu mají nemocní

s lymfoblastickým zvratem CML (asi 20 – 30 %) než nemocní s myeloblastickým zvratem CML (asi 70-80 %) (Mayer, 2002; Faber, 2010).

Univerzální a všeobecně platná definice jednotlivých fází CML (zejména akcelerované fáze) neexistuje. V literatuře se objevují mnohé definice fází CML používané jednotlivými centry pro léčbu CML, většinou však byly vytvořené před érou léčby IM. Obsahují některá společná kritéria – procenta bazofilů, blastů, promyelocytů v krvi nebo kostní dřeni, počty trombocytů, přítomnost přídatných cytogenetických změn v Ph pozitivním klonu. Většina studií nezohledňuje při zařazování nemocných do skupin, zda jsou akcelerovaná fáze nebo blastický zvrát výsledkem progresse onemocnění během léčby nebo se choroba manifestovala v pokročilejším stadiu onemocnění. V roce 2006 navrhl J.E.Cortes nové hodnocení fází CML podle kritérií uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1: Hodnocení fází CML (Faber, 2010)

Blastická fáze : <ul style="list-style-type: none">▪ blasty v periferní krvi nebo kostní dřeni $\geq 30\%$▪ extramedulární blastická infiltrace
Akcelerovaná fáze : <ul style="list-style-type: none">▪ blasty v periferní krvi nebo kostní dřeni $10 - 29\%$▪ splenomegalie, leukocyty $> 10 \cdot 10^9/l$ nebo trombocyty $> 1000 \cdot 10^9/l$ neodpovídající na nepřerušovanou léčbu▪ trombocyty $< 100 \cdot 10^9/l$ nesouvisející s léčbou▪ bazofily v krvi nebo kostní dřeni $\geq 20\%$▪ blasty a promyelocyty $\geq 30\%$
Chronická fáze :
Vysoké riziko : <ul style="list-style-type: none">▪ trombocyty $> 1000 \cdot 10^9/l$ před zahájením léčby▪ v době diagnózy nepřítomná přídatná cytogenetická změna
Nízké riziko : <ul style="list-style-type: none">▪ bazofily v krvi nebo kostní dřeni $< 10\%$▪ blasty a promyelocyty v krvi nebo kostní dřeni $< 20\%$▪ v době diagnózy přítomná přídatná chromosomová změna

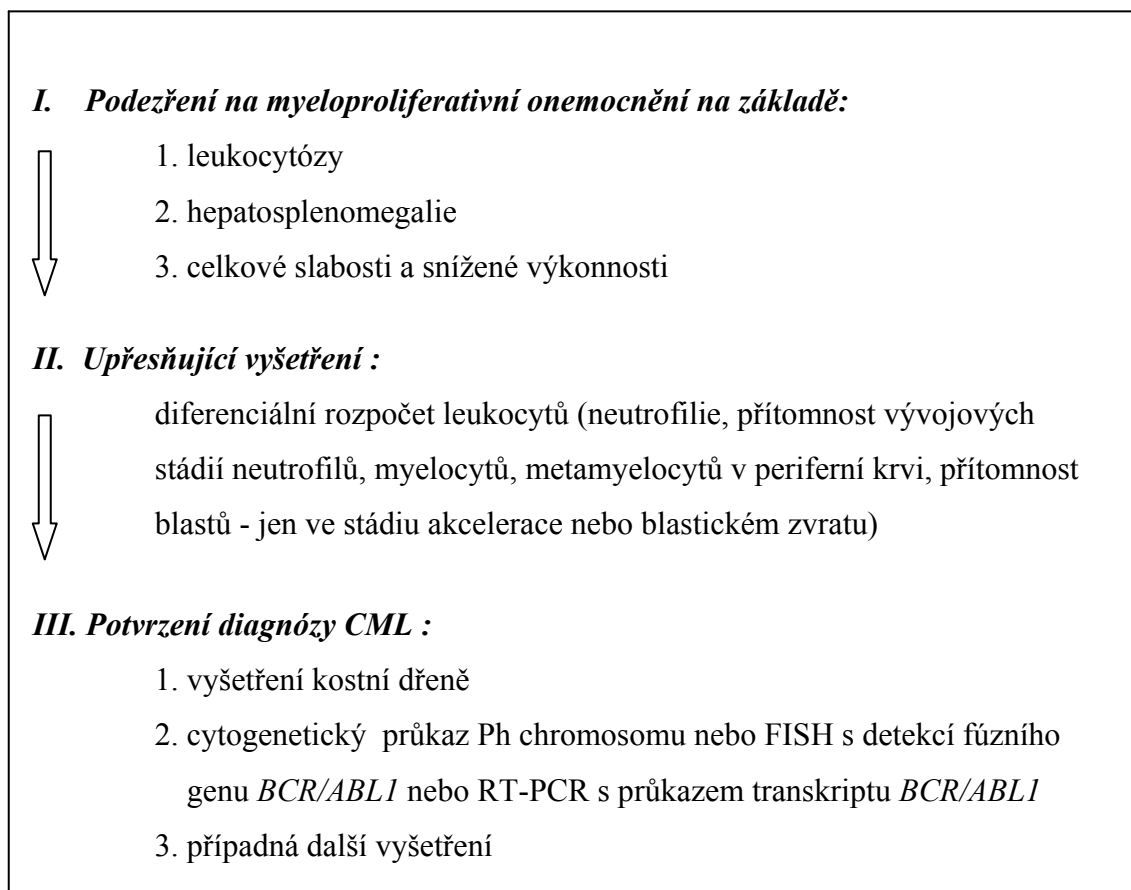
2.4 Diagnostika CML

Stejně jako ostatní hematologické malignity, je i CML součástí klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně, jejíž poslední revidované vydání bylo publikováno v roce 2008 (Vardiman, 2009).

CML je řazena mezi myeloproliferativní neoplasie a tvoří samostatnou podskupinu „Chronic myelogenous leukemia, *BCR/ABL1*-positive“. Hlavním kritériem pro diagnózu CML je detekce fúzního genu *BCR/ABL1*.

Klinická diagnostika CML je založena na fyzikálním vyšetření a na hodnotách laboratorních vyšetření a řídí se algoritmem vyšetřování (Tabulka 2).

Tabulka 2: Algoritmus diagnostického postupu vyšetřování uvádí následující schéma :



Fyzikálním vyšetřením v časných stádiích chronické fáze se prokáže zpravidla pouze mírná splenomegalie, která se v pokročilejších stádiích onemocnění a s rostoucím počtem

leukocytů zvětšuje, může se objevit i hepatomegalie, krvácivé projevy a ve velmi pokročilých případech také extramedulární postižení (např. zvětšení mízních uzlin nebo kožní infiltráty).

Laboratorní diagnostika se opírá o vyšetření krevního obrazu, cytologické a histologické vyšetření kostní dřeně, vyšetření biochemických markerů (laktátdehydrogenáza, vitamín B12, kyselina močová), ale diagnózu jednoznačně potvrdí pouze cytogenetické, molekulárně cytogenetické (fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH) nebo molekulárně biologické vyšetření s nálezem fúzního genu *BCR/ABL1*.

Vyšetření krevního obrazu : typickým znakem nemoci je výrazná leukocytóza v periferní krvi, která může dosahovat hodnot $20 - 500 \times 10^9/l$ (Faber, 2010) s posunem doleva k nevyzrálým formám granulocytů (myelocyty, metamyelocyty, promyelocyty, blasty). Blasty a promyelocyty v chronické fázi CML většinou nepřesahují 10 – 15 % buněk v diferenciálním rozpočtu periferní krve. Častým nálezem je zvýšený počet bazofilních a eozinofilních granulocytů. Bývá přítomna anémie, počet destiček je normální nebo zvýšený až na hodnoty $400 - 1000 \times 10^9/l$. V nátěru se nacházejí gigantické trombocyty a příležitostně také jádra megakaryocytů.

Punkce kostní dřeně: kostní dřeň je hypercelulární se zmnožením granulocytární řady a redukovanou erytropoézou. Je patrný posun doleva se zmnožením myelocytů. Histologické vyšetření kostní dřeně mnohdy prokáže zmnožení retikulinových vláken. Během akcelerované fáze CML přibývá v kostní dřeni bazofilů a blastů, objevují se dysplastické změny. Aspirace kostní dřeně může být obtížnější až neúspěšná pro nárůst fibrózy dřeně (Faber, 2010).

Cytogenetické vyšetření kostní dřeně potvrdí jednoznačně diagnózu CML nálezem Ph chromosomu nebo fúzního genu *BCR/ABL1* metodou FISH.

Molekulárně biologické metody – metodou RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptázy) je možné prokázat nejen přítomnost fúzního transkriptu *BCR/ABL1*, ale lze také rozlišit jeho typ (e1a2, b2a2, b3a2, e19a2). Většina nemocných má přestavbu v major oblasti, u malého procenta nemocných s CML je při diagnóze onemocnění detekována přestavba v minor oblasti.

2.5 Léčba CML

I v současnosti je alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk jedinou formou léčby vedoucí k vyléčení CML (Mayer, 2002). Negativem je poměrně velká toxicita a mortalita vázaná na vlastní výkon. O výsledku transplantace kostní dřeně rozhoduje řada faktorů (věk pacienta, stádium onemocnění, interval od diagnózy k transplantaci kostní dřeně, pohlaví dárce a řada dalších).

U pacientů s CML, kteří nemohou podstoupit alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk, bylo cílem léčby, před érou cílené terapie, oddálení blastického zvratu onemocnění a prodloužit tak jejich přežití.

V chronické fázi onemocnění se k léčbě do nedávné doby používal zejména interferon alfa (IFN- α) a perorální chemoterapie, eventuálně kombinovaná léčba. V perorální chemoterapii CML je základním lékem hydroxyurea. Její účinek nastupuje rychle, dobře se hodí k razantní redukci leukocytů před zahájením léčby IFN- α (Faber, 2010).

Intenzivní dávkování hydroxyureou vede ke kompletní nebo parciální hematologické remisi (až u 80 % nemocných), avšak podíl nemocných, kteří dosáhnou cytogenetické odpovědi, nepřesahuje 5 %. (Faber, 2010 dle Hehlmann, 1994).

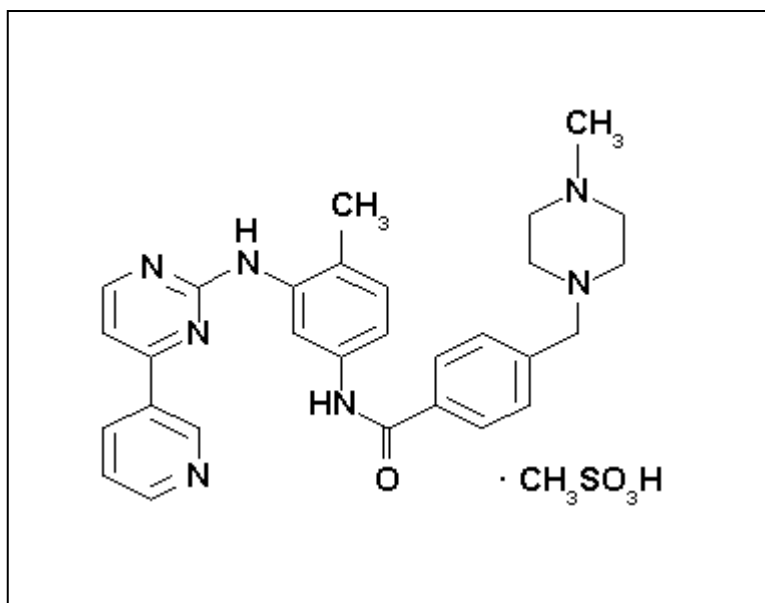
Dalším možným lékem je busulfan, který má však řadu nežádoucích účinků. Využívá se při přípravě k alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk a k léčbě akcelerované fáze s rezistencí na hydroxyureu.

Interferon-alfa (IFN- α) byl před nástupem cílené léčby inhibitory tyrosinové kinázy indikován k léčbě CML u všech nemocných, u kterých nelze provést alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. Touto léčbou se přežití pacientů prodlouží až o 20 měsíců v porovnání s perorální léčbou. Hematologické remise dosáhne 50 – 80 % nemocných. Velké cytogenetické odpovědi dosáhne 10 – 40 % nemocných a 5 – 25 % nemocných dosáhne kompletní cytogenetické odpovědi. 20 – 30 % nemocných je na léčbu IFN- α rezistentních (Mayer, 2002).

V dnešní době je léčbou první linie u všech nově diagnostikovaných nemocných s CML cílená terapie inhibitory tyrosinových kináz. Historicky prvním preparátem této třídy léků je imatinib (IM).

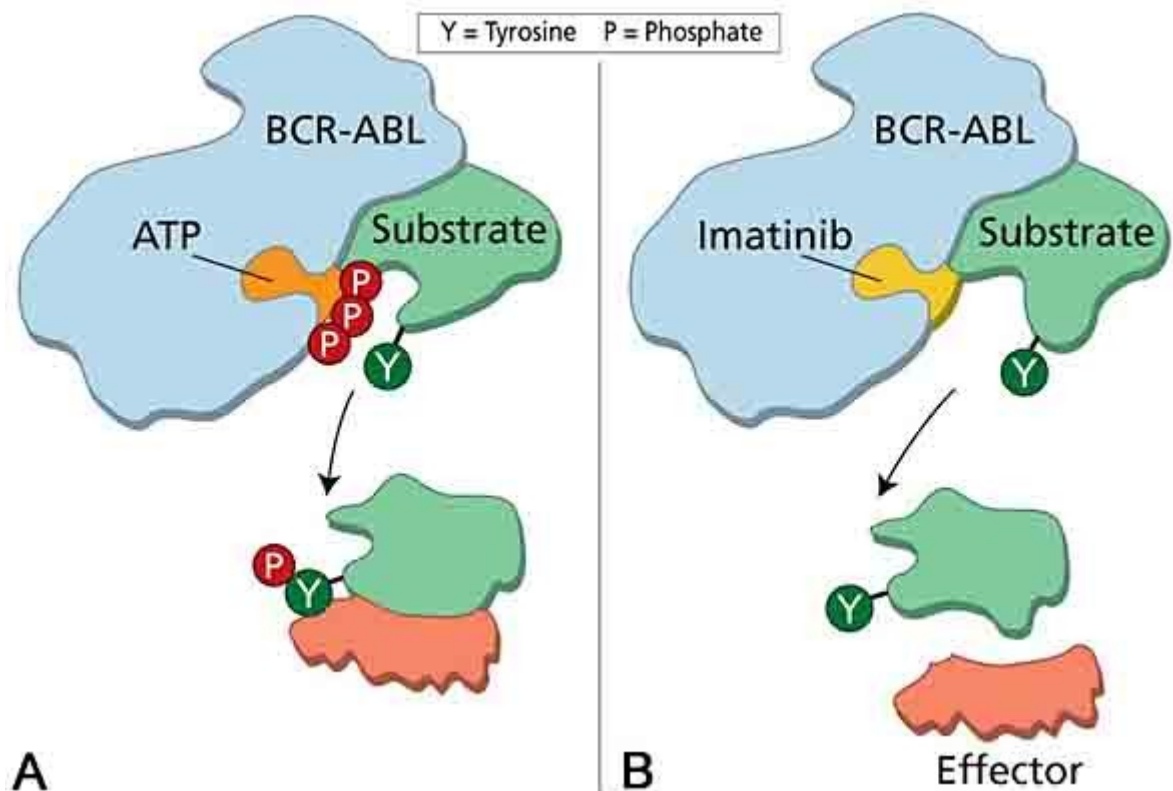
IM (STI 571, signal transduction inhibitor, chemický derivát fenylaminopyrimidinu) (Obrázek 9) je látka, u které byla počátkem 90. let zjištěna schopnost selektivně inhibovat

tyrosinkinázovou aktivitu Abl1. Mechanismus účinku je založený na obsazení vazebného místa pro ATP (Goldman, 2003; Klener, 2004) (Obrázek 10). Vazba ATP na Bcr/Abl1 tyrosinkinázu zajišťuje autofosforylaci Bcr/Abl1 a následně fosforylaci tyrozinových zbytků bílkovinných substrátů, které aktivují celou řadu signálních drah, jež vedou k rozvoji leukemického fenotypu buňky. IM jako selektivní kompetitivní inhibitor kinázové domény Bcr/Abl1 tuto vazbu zablokuje, a tím zabrzdí leukemogenní aktivity *BCR/ABL1* v leukemických buňkách, což vede k jejich apoptóze. U 90 % nemocných indukuje IM hematologickou odpověď a u 70 % nemocných i odpověď cytogenetickou. IM se podává dlouhodobě a bohužel během léčby se asi u 1/3 nemocných (u nichž byla terapie zahájena při stanovení diagnózy) vyvine rezistence k IM. V tomto případě je indikovaná léčba inhibitory tyrosinkináz 2. generace (dasatinib, nilotinib, bosutinib).



Obrázek 8: Chemická struktura IM

(Převzato: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9e/IM_mesylate.png)



Obrázek 9: Schéma mechanismu působení IM. **A.** Bcr/Ab11 tyrosinkináza váže ATP, dochází k autofosforylaci Bcr/Ab11 a transferu fosfátu na tyrosinová rezidua různých substrátů, čímž dochází k jejich aktivaci. **B.** Blokování místa pro navázání ATP blokuje i tyrosinkinázovou aktivitu Bcr/Ab11. (Podle: Mughal a Goldman, 2006)

2.6 Prognóza CML

Délka přežití nemocných v chronické fázi onemocnění je velmi heterogenní (od 2 do 15 až 20 let) a průběh onemocnění je ovlivněn řadou faktorů s různým prognostickým významem. Zásadní význam pro prognózu CML má cílená terapie inhibitory tyrosinových kináz a dosažená léčebná odpověď (Cortes, 2004).

Na základě vstupních hodnot krevního obrazu včetně diferenciálního rozpočtu a velikosti splenomegalie je možné stanovit prognostické indexy, které jsou před zahájením léčby jediným faktorem umožňujícím odhadnout odpověď na léčbu. Nejpoužívanější jsou dva prognostické indexy – Sokalův index a Hasfordův index. Oba rozdělují nemocné

v chronické fázi CML do skupin s nízkým, středním a vysokým rizikem. **Sokalův index** byl vytvořen na základě multivariační analýzy klinických charakteristik velkých souborů nemocných léčených v chronické fázi chemoterapií, busulfanem a hydroxyureou (Faber, 2010 dle Sokala, 1984). **Hasfordův index** (Nové prognostické skóre, Euro index) vznikl v období léčby interferonem (Hasford, 1998) a rozlišoval 3 prognostické skupiny lépe než Sokalův index. Oba prognostické indexy se používají i nyní, v éře IM, kdy všeobecně uznávaný prognostický model pro nemocné léčené IM zatím nebyl vytvořen.

Způsob léčby je jedním z důležitých faktorů ovlivňující průběh nemoci. Medián celkového přežití bez léčby a při radioterapii (28 měsíců), která se používala k léčbě CML v první polovině 20. století, se výrazně nelišil. Léčba busulfanem a hydroxyureou délku přežití mírně prodloužila (medián 35 – 48 měsíců). K zásadní změně došlo po zavedení alogenní HSCT (Hematopoietic stem cell transplantation, transplantace hematopoetických kmenových buněk), která vedla u některých nemocných k vyléčení. Medián přežití u nemocných po alogenní HSCT v chronické fázi se pohybuje kolem 15 let.

Při léčbě interferonem dosahuje 10 – 20 % nemocných kompletní cytogenetickou odpověď. U nemocných s kompletní cytogenetickou odpovědí, dosaženou léčbou interferonem, byla pravděpodobnost desetiletého přežití 78 % (Faber, 2010 dle Kantarjian, 2003). Řada nemocných musela ukončit léčbu interferonem pro nežádoucí účinky a špatnou toleranci léčby.

IM dokáže navodit kompletní cytogenetickou odpověď až u 40 % nemocných v pozdní chronické fázi CML, kteří ukončili léčbu interferonem pro špatnou toleranci, a u 70 % nemocných, u kterých byla léčba IM nasazena jako léčba první linie časně po stanovení diagnózy.

V akcelerované fázi je prognóza nemocných horší než ve fázi chronické. Nemocní léčení IM mají lepší odpověď na terapii, nicméně riziko rozvoje rezistence je stále poměrně vysoké - přibližně u 50 % nemocných v akcelerované fázi se po dvou letech objevuje rezistence na IM, po 4 letech se počet rezistentních nemocných zvyšuje až na 75 % (Faber 2010 dle Guilhot 2007). Zlepšení prognózy nemocných v akcelerované fázi CML přinesly TKI druhé generace – dasatinib a nilotinib.

U nemocných v blastickém zvratu je IM dostatečně efektivní jen u malé části nemocných a účinek je krátkodobý. Naprostá většina nemocných v blastické fázi CML je na IM rezistentní (Faber, 2010).

Obecně lze říci, že IM se na základě výborných výsledků v klinických studiích stal novým zlatým standardem úvodní léčby CML. Medián přežití pacientů s CML diagnostikovanou v chronické fázi se nyní předpokládá více než 25 let. Přes vynikající účinnost IM u většiny pacientů s CML, existuje část nemocných (cca 30 %), u nichž léčba primárně selhává. V tomto případě jsou k dispozici další prostředky ke zvládnutí rezistence, tzv. TKI 2. generace: **dasatinib (Sprycel®)** schválený pro užití v klinické praxi v r. 2006 pro CML rezistentní nebo netolerující IM napříč všemi fázemi onemocnění a **nilotinib (Tasigna®)**, schválený o rok později pro stejné případy, vyjma blastickou krizi CML. Zatím nejsvízelnějším momentem při rezistenci na TKI je objevení se mutace T315I v *ABL1* kinázové doméně, která je indikací k provedení alogenní transplantace krevetvorných buněk (<http://www.leukemia-cell.org>).

3 CYTOGENETIKA A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKA CML

3.1 Historie objevu chromosomu Philadelphia

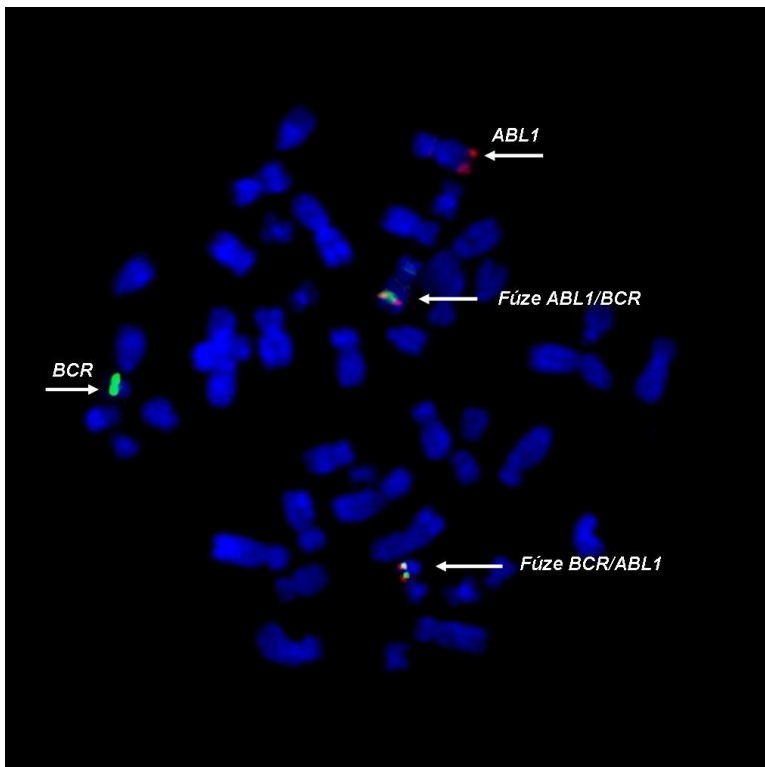
CML je prvním lidským nádorovým onemocněním, které bylo dáno do souvislosti se specifickou chromosomovou změnou. V roce 1960 popsali ve Philadelphii Peter Nowell a David Hungerford v karyotypu nemocných s CML nález malého chromosomu. Na základě velikosti a morfologických znaků jej zařadili do G skupiny chromosomů a vzhledem k nedokonalosti konvenčního barvení jej zpočátku považovali za chromosom 21. Později s rozvojem barvicích technik, bylo zařazení chromosomu upřesněno. V roce 1973, zavedla Janet Rowleyová pruhovací techniku barvení chromosomů a tento Philadelphia chromosom určila jako derivovaný chromosom 22, výsledek reciproké translokace mezi chromosomy 9 a 22, $t(9;22)(q34;q11)$ (Rowley, 1973).

Další informace o mechanismu vzniku translokace a genech, které se translokace účastní, souvisí s rozvojem molekulárně biologických metod. V roce 1983 bylo prokázáno, že do translokace je zapojen protoonkogen *ABL1*, lokalizovaný na chromosomu 9, který je lidským homologem virového onkogenu Abelsonovy myši leukémie (Heisterkamp, 1983). O rok později, v roce 1984, byl popsán partnerský gen, který se účastní translokace (Groffen, 1984). Funkce partnerského genu, který leží na chromosomu 22, byla v tehdejší době neznámá, proto byl označen „breakpoint cluster region“ (*BCR*). Název vychází z charakteristické vlastnosti – vytváření nestálých chromosomových zlomů. Po roce 1990 byl podrobněji popsán produkt genu *BCR/ABL1*, kterým je protein Bcr/Abl1. Aktivita proteinu Bcr/Abl1 způsobuje deregulaci signálních drah a buněčných procesů, které ústí v nádorovou transformaci buňky. Transformační potenciál Bcr/Abl1 byl prokázán na mnoha modelech *in vitro* a *in vivo* (Daley, 1990; Gishizky, 1992). Ve stejném roce byl vyvinut myší model CML. Podle něj lze přenesením *BCR/ABL1* pozitivních lidských hematopoetických buněk vyvolat u myši myeloproliferativní onemocnění, které je shodné s lidskou CML (Elefanty, 1990).

Dnes je již prokázáno, že translokace a vznik fúze *BCR/ABL1* je změnou, která spouští maligní transformaci, a ukazuje se, že iniciační událostí této transformace je právě fúze

BCR/ABL1. Fúzní gen *BCR/ABL1* je lokalizován na chromosomu 22q- a reciproční fúze *ABL1/BCR* na chromosomu 9q+ (Obrázek 10).

Dosud neexistují jasné důkazy o tom, že vzniku Ph chromosomu předchází nějaké cytogenetické a molekulárně-genetické změny, a proto je translokace t(9;22)(q34;q11) s fúzí *BCR/ABL1* považována za iniciující událost, která vede ke vzniku CML.



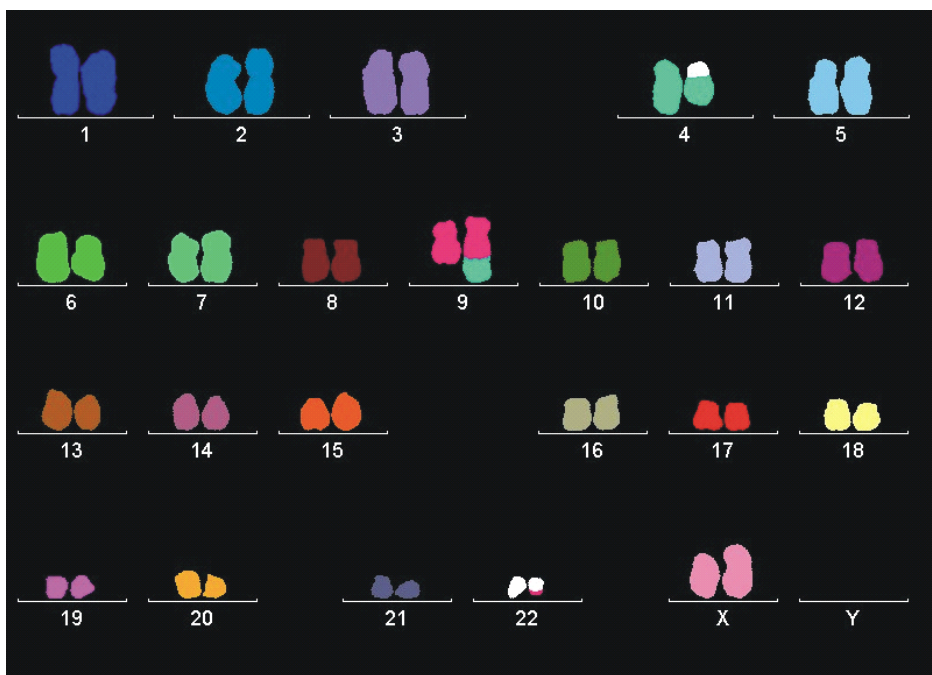
Obrázek 10: FISH s lokusově specifickou sondou LSI BCR/ABL Dual Color Dual Fusion Abbott Molecular (Holzerová, Hemato-onkologická klinika FN a LF Olomouc, 2006)

3.2 Variantní translokace vzniku Ph chromosomu

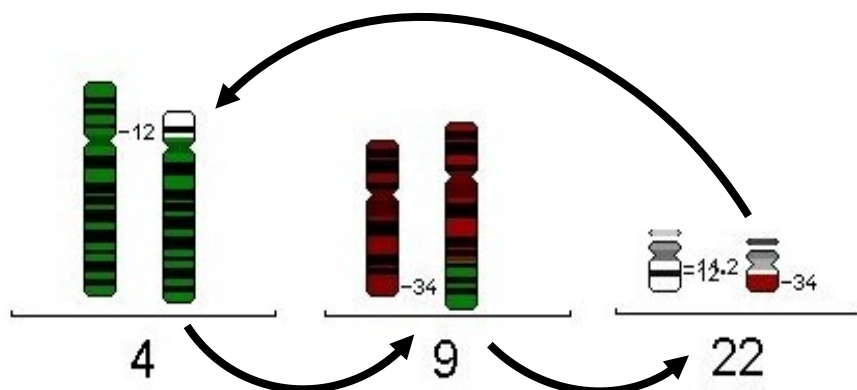
Ve většině případů vzniká Ph chromosom klasickou reciprokovou translokací, při níž dochází k výměně genetického materiálu mezi chromosomy 9 a 22. Přibližně u 5 – 10 % nemocných byla v době diagnózy popsána tzv. variantní translokace, do které je kromě chromosomu 9 a 22 zahrnut ještě jeden nebo více dalších chromosomů (Obrázek 11 a 12). Bylo již popsáno více jak 300 Ph variantních translokací, do kterých jsou zapojeny téměř

všechny chromosomy, včetně pohlavních. Nejčastěji se však variantních translokací účastní chromosomy 3, 11, 12, 14 a 17 (Fitzerald, 1991).

Mechanismus vzniku variantních translokací není zcela přesně znám, existují však dvě teorie vzniku těchto translokací. Podle první se předpokládá, že se jedná o jednostupňový proces, při kterém dojde ve stejném čase na třech různých chromosomech ke zlomům a reciproké výměně genetického materiálu (Fitzgerald, 1991, 1992). Podle druhé teorie jde o proces vícestupňový. Základem je klasická translokace t(9;22), po níž následuje translokace zahrnující další chromosom (O'Brien, 1997). Obě tyto teorie předpokládají, že zlomy na chromosomech, které leží v jádře v těsné blízkosti, způsobuje stejné agens.



Obrázek 11: M-FISH karyotyp: 46,XX,t(4;9;22) (Holzerová, Hemato-onkologická klinika FN a LF Olomouc, 2008)



Obrázek 12. Schematické znázornění vzniku variantní translokace: $t(4;9;22)$ (Holzerová, Hemato-onkologická klinika FN a LF Olomouc, 2008)

První studie nemocných s variantní translokací analyzovaly pouze malé soubory pacientů a informovaly o horší prognóze těchto nemocných. Studie hodnotící naopak velké soubory nemocných prokázaly, že prognóza nemocných s variantní translokací je stejná jako prognóza nemocných s klasickou translokací (El-Zimaity, 2004).

Kromě klasické translokace vzniku Ph chromosomu a translokace variantní, může dojít k submikroskopickým chromosomovým změnám, při kterých nelze cytogenetickou analýzou Ph chromosom určit. Tento typ přestavby se vyskytuje přibližně u 5 % nemocných a bývá označen jako kryptická translokace nebo „maskovaný“ Ph chromosom. Při kryptické translokaci dojde ke dvěma zlomům na dlouhých ramenech chromosomu 9, při kterých je oblast 3' *ABL1* genu insertována do oblasti *BCR* genu na chromosomu 22.

Příčina vzniku chromosomových zlomů a vznik translokace není zcela uspokojivě objasněna. Zlomy dvoušroubovice DNA mohou být způsobeny mnoha faktory: oxidativním stresem, radiací, genotoxickými chemikáliemi nebo replikačním stresem. Jsou-li těmito mechanismy zasaženy geny kódující tyrosinové kinázy, může dojít k vytvoření chimerických genů, které kódují fúzní tyrosinovou kinázu. Snaha o vysvětlení příčin vzniku zlomů na chromosomu 9 a 22 vedla k řadě experimentů např. s různými typy záření. Byly provedeny experimenty, při nichž byly lidské lymfocyty ozářeny neutrony a ty

prokázaly 11krát vyšší incidenci aberací chromosomů 9 a 22, než se předpokládalo (Deininger, 1998). Nicméně ani tato pozorování neprokázala zásadní vliv exogenních agens na vznik zlomů a formaci Ph chromosomu. V současnosti se domníváme, že chimerický *BCR/ABL1* gen je výsledkem nesprávné opravy dvou zlomů v genech, které kódují *BCR* a *ABL1* a vede k reciproké translokaci t(9;22) (Goldman, 2008).

3.3 Přídavné chromosomové změny

V době diagnózy CML je možné kromě Ph chromosomu nemocných nalézt i další přídavné chromosomové změny. Přídavnou chromosomovou změnou tedy rozumíme nálezy další chromosomové změny kromě translokace t(9;22).

Přídavné změny se mohou vyskytovat nejen v době diagnózy onemocnění, ale především v době blastického zvratu CML. Přídavné chromosomové změny detekovatelné G-pruhováním se v době diagnózy CML objevují u 10 % nemocných, v blastické fázi detekujeme přídavné změny u 60 – 80 % nemocných (Johansson, 2002). Výskyt těchto změn je nenáhodný. Nejčastěji nacházíme trisomii chromosomu 8 (+8), další Ph chromosom (+Ph), isochromosom dlouhých ramen chromosomu 17 i(17q), trisomii chromosomu 19 (+19), chybění chromosomu Y u mužů (-Y), trisomii chromosomu 21 (+21), trisomii chromosomu 17 (+17) nebo monosomii chromosomu 7 (-7) (Johansson, 2002). Procentuální výskyt přídavných změn ukazuje tabulka 3:

Tabulka 3: Frekvence a typ přídatných chromosomových změn (Upraveno podle Johanssona, 2002)

Přídavná změna	Zápis	% výskytu
trisomie chromosomu 8	+8	38 %
další Ph chromosom	+Ph	30 %
isochromosom 17q	i(17q)	20 %
trisomie 21	+21	7 %
chybění chromosomu Y	-Y	8 %
trisomie chromosomu 17	+17	5 %
monosomie chromosomu 7	-7	5 %
trisomie chromosomu 19	+19	13 %
translokace t(3;21)	t(3;21)(q26;q22)	2 %
translokace t(7;11)	t(7;11)(p15;p15)	1 %
komplexní změny		<1 %

Jako hlavní nebo velké přídatné změny („major route“) jsou označovány + Ph, +8, +19 i(17q), ostatní změny jsou označovány jako malé („minor route“) (Johansson, 2002).

Nejčastější přídatnou chromosomovou změnou je **trisomie chromosomu 8**. Příčina vzniku této změny není dosud vyjasněna. Na chromosomu 8 v pruhu q24 je lokalizovaný *CMYC* gen. Očekávalo by se tedy, že trisomie chromosomu 8 bude spojena s nadměrnou expresí c-Myc a že bude souviset s patogenezí progresu onemocnění. Bylo však pozorováno, že c-Myc je sice amplifikován a nadměrně exprimován v blastické fázi CML (Blick, 1987), ale nebyla zcela jasně určena korelace mezi trisomií chromosomu 8 a *CMYC* amplifikací/expresí (Jennings, 1998). Navíc, analýzy pomocí čipů u AML s trisomií chromosomu 8 jako sólo aberací odhalily řadu nadměrně exprimovaných genů jak na chromosomu 8, tak na jiných chromosomech a sníženou expresi dalších genů včetně genu *CMYC* (Virtaneva, 2001). Patogenetický efekt trisomie 8 nemusí být tedy vázán na nadměrnou expresi specifických genů nebo jednoho specifického genu. Nicméně exprese dominantně-negativních c-Myc molekul potlačuje Bcr/Abl1-dependentní transformaci a léčba CML-BZ buněk s c-Myc antisense oligonukleotidy potlačuje *in vitro* tvorbu kolonií a *in vivo* leukemogenezi (Skorski, 1996). Poněkud kuriózní je, že trisomie 8 je častým znakem případů s klonálním vývojem u nemocných s CML léčených IM, kteří jsou v cytogenetické remisi – nemají Ph, ale jen +8 v Ph negativním klonu. Zdá se, že tyto

případy mají benigní průběh, naznačující, že trisomie 8 sama o sobě nemusí být leukemogenní. Kim se spolupracovníky v roce 2008 analyzoval 470 nemocných s CML léčených IM a zjistil, že trisomie 8 se na léčbě v Ph- klonu vyvinula u 1,5 % nemocných. U žádného nemocného se nevyvinula myelodysplázie ani akutní leukémie, a podle autorů je tedy +8 transientní změnou (Kim, 2008).

Druhou častou přídatnou chromosomovou změnou u nemocných s CML je **isochromosom dlouhých ramen chromosomu 17, i(17q)**. Teorie vzniku isochromosomu předpokládá ztrátu určité části genetického materiálu a naopak, zmnožení jiné části genetického materiálu krátkých a dlouhých ramen chromosomu.

Při vzniku isochromosomu i(17q) dochází ke ztrátě jedné kopie genu *TP53*. Vzhledem k tomu, že mutace není u těchto nemocných pozorována, je otázkou, jaký je podíl delece na progresi onemocnění. Celkové snížení p53 může být zahrnuto do celkové regulace apoptózy a mohlo by se na progresi podílet. Také se spekuluje o roli neznámých genů lokalizovaných na 17q. Konečné důsledky této změny je nutné ještě určit (Johansson, 2002).

Asi u 8 % mužů s CML můžeme pozorovat **ztrátu pohlavního chromosomu Y**. Tato změna je u starších mužů považována za fenomen spojený s věkem, protože se ztráta Y vyskytuje v normálních buňkách starších mužů. Vysvětlení pro mladší nemocné zatím chybělo. Lippert a spolupracovníci publikovali v roce 2010 studii 60 mužů s Ph+ CML léčených IM, ve které srovnávali 30 mužů se ztrátou chromosomu Y (Y-) a 30 bez ztráty chromosomu Y (Y+). Pacienti Y- měli opožděné dosažení cytogenetické i molekulárně genetické odpovědi, nižší EFS (event free survival, přežití bez události) a kratší OS (overall survival, celkové přežití) než pacienti s Y+. Tento negativní vliv byl výraznější, pokud šlo o klonální vývoj ve srovnání s nálezem ve všech mitózách. V této souvislosti se uvažuje o tom, zda by tito pacienti neměli být léčeni vyšší dávkou IM nebo jinou TKI.

Nález **komplexních chromosomových přestaveb** (komplexní karyotyp), tedy nález tří a více chromosomových změn, je v chronické fázi CML spíše vzácný a význam a frekvence různých chromosomových změn nejsou dostatečně prostudovány. Výskyt komplexních přestaveb je vázán na pokročilejší formy onemocnění – vyskytují se cca u 30 % nemocných v akcelerované fázi a u 70 – 80 % nemocných v blastické krizi (Falchi, 2010) a jsou známkou klonálního vývoje karyotypu spojeného s nestabilitou nádorového genomu. Součástí komplexních strukturních přestaveb jsou především nebalancované genetické změny - delece, duplikace a amplifikace (Su, 1999; Babická, 2006).

Obecně se předpokládá, že nemocní s přídatnými chromosomovými změnami spadají do skupiny nemocných s horší prognózou. Nález přídatných chromosomových změn je považován za známku akcelerace onemocnění, přesto nemusí být příčinou transformace CML. Mechanismus zodpovědný za přechod chronické fáze CML do blastického zvratu není přesně znám. Předpokládá se však, že zvýšená exprese *BCR/ABL1* souvisí se sekundárními chromosomovými změnami, které jsou v blastické krizi časté a stimulují expanzi maligních buněčných klonů. Molekulárně genetická analýza akcelerované fáze a blastického zvratu CML prokázala abnormality genů, které hrají významnou roli v maligním procesu – *CDKN2A*, *MYC*, *RAS*, *RBI* a *TP53* (Barboui 2002). *TP53* a *RBI* jsou nádorové supresorové geny, které se podílejí na regulaci buněčné proliferace a apoptózy. Při poškození DNA dochází k zvýšené expresi *TP53* a zastavení buněčného dělení v G1 fázi, kdy se spouští mechanismy k opravě poškozené DNA. Pokud však DNA není opravena, spouští *TP53* apoptózu. Proto je *TP53* nazýván strážcem genomu. *RBI* gen je důležitý pro regulaci progresu buněčného cyklu. Zabraňuje přechodu do S-fáze buněčného cyklu. Porušením základních funkcí těchto genů dojde k nekontrolované proliferaci a snížení apoptózy, diferenciace však ovlivněna není. Vliv těchto genů na diferenciaci buněk v blastické fázi je pouze sekundární. Předpokládá se, že v blastické krizi primárně dochází k deregulaci transkripčních faktorů, které se podílejí na řízení diferenciace; přesný mechanismus diferenciačního bloku v blastické fázi a role konkrétních transkripčních faktorů však není zatím přesně popsán (Perrotti, 2002; Pabst 2006). Nadějí na určení kandidátních genů, které se mohou podílet na vývoji blastické fáze onemocnění, je zavedení čipových technologií. Výsledky expresních studií však zatím nejsou jednoznačné, nicméně potvrzují rozdílnou expresi nejméně 20 genů ve fázi blastické ve srovnání s fází chronickou (Radich, 2006; Yong, 2006).

U nemocných s rezistencí k IM dochází ke subklonálnímu vývoji jako mechanismu rezistence. U nemocných, u kterých selhala léčba IM, je efektivní terapií léčba druhou generací TKI (dasatinib a nilotinib). Dosud publikovaná studie souboru nemocných léčených dasatinibem (Verma, 2010) ukázala, že nemocní s přídatnými změnami a dalšími známkami AF mají nepříznivou prognózu. Multivariantní analýzou však nebylo prokázáno, že subklonální vývoj je nezávislým prognostickým faktorem. Ve studii, která analyzovala nemocné léčené nilotinibem, bylo potvrzeno celkové horší přežití i odpověď na léčbu (Kim, 2010).

3.3.1 Delece 9q

Molekulárně cytogenetická metoda, fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), dovoluje pomocí genově specifických sond určit fúzi genů *BCR/ABL1* jak na chromosomech, tak i na interfázních jádrech.

Rutinní využití metody FISH pro rychlou detekci fúze již na svém počátku odhalilo cytogeneticky nepoznané delece, provázející zlomová místa translokace na derivovaném chromosomu 9 a 22. Delece na derivovaném chromosomu 9 se vyskytuje u 10 – 15 % nemocných se standardní Ph translokací (Sinclair, 1997, 2000; Herens, 2000; Huntly 2001, 2003) a více jak u 30 % nemocných s variantní Ph translokací (Huntly, 2001).

Bylo prokázáno, že k delecím oblastí přiléhajících ke zlomovým místům zapojených do translokace t(9;22) dochází současně se vznikem Ph chromosomu. Delece nesouvisí s progresí onemocnění a není projevem klonální evoluce. Srovnávací studie, zabývající se analýzou delecí 9q+ a 22q- u nemocných CML v progresi onemocnění s přechodem do blastické fáze a v době diagnózy onemocnění, prokázaly přítomnost delecí jak v době blastické krize, tak i v době diagnózy onemocnění (Li, 2008).

Ve většině případů (asi 78 % případů delecí 9q) dochází k delecí na obou chromosomech, na der(9) i der(22), méně časté jsou pouze delece 9q (19 %) a delece pouze na 22q jsou poměrně vzácné (4 %) (Fourouclas, 2006).

Molekulárně genetické analýzy prokázaly rozdíly v rozsahu delecí – od několika desítek kb (Popenoe, 1986) až po oblasti o velikosti téměř 25 Mb, ve kterých je lokalizováno až 300 kandidátních tumor supresorových genů (Fourouclas, 2006). Uvádí se, že větší delece jsou spojovány s horší prognózou, nemocní častěji přecházejí z chronické fáze do blastické krize a jejich celkové přežití je kratší než u nemocných s delecí malého rozsahu (Fourouclas, 2006).

Pro nemocné léčené hydroxyureou nebo IFN- α představuje delece 9q riziko nepříznivé prognózy (Huntly, 2001; Kolomietz, 2001). Ne všechny studie však považují delecí 9q za nepříznivý ukazatel prognózy onemocnění (Quintas-Cardama, 2005; Kim, 2008). Zavedením léčby IM může být nepříznivý prognostický efekt této delece částečně překonán. Léčba IM navozuje CCyR u 70 % nemocných s 9q+ delecí, včetně nemocných s přídatnými změnami. Zdá se, že není rozdíl v celkovém přežití a odpovědi na léčbu u nemocných s delecí a bez delece, pokud jsou léčeni IM (Castagnetti, 2010).

3.3.2 Chromosomové změny v Ph negativním klonu

Před zavedením léčby IM představovala léčba CML období, ve kterém byla k léčbě nemocných s CML používána hydroxyurea, IFN- α samotný nebo v kombinaci s cytosin arabinosidem a nebo, pro některé nemocné, byla zvolena transplantace hemopoetických buněk. Léčba IFN- α vedla k dosažení velké cytogenetické odpovědi u 25 % pacientů, kompletní cytogenetické odpovědi dosáhlo asi 10 % nemocných. Během léčby IFN- α byl pozorován vývin chromosomových změn v Ph negativním klonu. Práce Lin a spolupracovníků (2006) popisuje 11 nemocných, u kterých byla pozorována klonální změna v Ph- buňkách. Po zavedení léčby IM, bylo možné sledovat, že u některých nemocných dochází k vývoji chromosomových změn v Ph negativních metafázích, přestože nemocný odpovídá na léčbu (Medina, 2003; Terre, 2004; Bumm, 2003). Řada těchto klonálních změn byla dávana do souvislosti s vývojem myelodysplasie (MDS). Nejčastěji nalezenými změnami byly trisomie chromosomu 8 nebo monosomie chromosomu 7 (Bacher, 2005). Všechny tyto nálezy byly spojeny s morfoloickými dysplastickými změnami v kostní dřeni, zvláště v erytroidní a megakaryocytární línii. Řada pozorování však ukazuje výskyt chromosomových změn v Ph- klonu bez projevů MDS. Frekvence těchto změn se pohybuje v rozmezí 1,6 % - 20,6 % (Feldman, 2002; O'Shea, 2004). S narůstajícím počtem popsáných případů narůstá i počet hypotéz, které by mohly výskyt těchto změn objasnit

Přesto, že mechanismus vzniku a významu přídatných chromosomových změn v Ph- klonu není zcela jasný, je nutné tyto změny odlišit od klonálního vývoje CML, který je charakterizován nálezem přídatných chromosomových změn v Ph pozitivním klonu, a který je známkou nepříznivého vývoje onemocnění a kritériem transformace onemocnění.

3.4 Hodnocení cytogenetické odpovědi na léčbu

Odpověď nemocného na léčbu může být hodnocena na hematologické, cytogenetické nebo molekulární úrovni.

Kompletní hematologickou odpovědí rozumíme stav, kdy u pacienta s prokázanou vstupní splenomegálií není hmatná slezina, vymizí extramedulární postižení (pokud bylo iniciálně přítomno) i konstituční symptomy (extrémní únava, noční pocení, neinfekční teploty a redukce hmotnosti) a dochází k normalizaci parametrů krevního obrazu (trombocyty $< 450 \times 10^9/l$, leukocyty $< 10 \times 10^9/l$ a diferenciální rozpočet bez nezralých forem granulocytů a počtem bazofilů $< 5\%$).

Cytogenetická odpověď je monitorována vyšetřením buněk kostní dřeně nebo periferní krve klasickou cytogenetickou analýzou na přítomnost Ph chromosomu nebo metodou FISH, určující přítomnost fúzního genu *BCR/ABL1*. Ještě citlivější je vyšetření na úrovni transkriptu genu *BCR/ABL1* pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (Q-RT-PCR). Kompletní molekulární odpovědi (CMR, complete molecular remission) je dosaženo při negativním výsledku vyšetření pomocí RT-PCR, jako velká molekulární odpověď (MMR, major molecular remission) je hodnocen poměr *BCR/ABL1* ku *ABL1* (nebo k jinému „provoznímu“ genu) $< 0,1\%$ IS (international score).

V posuzování kvality cytogenetické odpovědi jsou v současné době akceptována kvantitativní kritéria ELN 2009, která rozlišují cytogenetickou odpověď: kompletní, parciální, malou, minimální a žádnou (Tabulka 4).

Cytogenetická odpověď		% Ph pozitivních buněk
Velká	Kompletní (CCyR)	0 %
	Parciální (PCyR)	1 – 35 %
Malá (Minor CyR)		36 – 65 %
Minimální (Minimal CyR)		66 – 95 %
Žádná (No CyR)		96 – 100 %

Tabulka 4: Hodnocení cytogenetické odpovědi na léčbu (Faber, 2010) :

CCyR – kompletní cytogenetická odpověď (complete cytogenetic remission),

PCyR – částečná cytogenetická odpověď (partial cytogenetic remission),

Minimal CyR – minimální cytogenetická odpověď (minimal cytogenetic remission)

No CyR – žádná cytogenetická odpověď (none cytogenetic remission)

Při léčbě IFN- α byl z hlediska dosažení cytogenetické odpovědi významný interval jednoho roku od zahájení léčby. Monitorování odpovědi se doporučovalo provádět alespoň jednou ročně. Také při léčbě IM a TKI druhé generace je dosažení velké cytogenetické odpovědi do jednoho roku léčby spojeno s obdobnou pravděpodobností přežití jako u nemocných se stejnou odpovědí po léčbě IFN- α (Roy, 2006). Ukazuje se, že dřívější dosažení odpovědi znamená pro nemocné prognostickou výhodu. Podle nejnovějších doporučení by se proto měla cytogenetická odpověď sledovat po 3, 6 a 12 měsících léčby (Baccarani, 2009). Standardně je nutné vyhodnotit 20 metafází. Po dosažení kompletní odpovědi je doporučováno provádět kontrolu jednou ročně.

U nemocných léčených IM je sledování hladiny Ph pozitivních buněk důležité z hlediska možného vývinu rezistence k léčbě TKI.

Primární rezistence na IM je definována jako nedosažení kompletní hematologické odpovědi po 3 měsících léčby (5 % nemocných), malé cytogenetické odpovědi po 6 měsících léčby a velké cytogenetické odpovědi po 12 – 18 měsících (15 % nemocných) (Shah, 2002). Sekundární rezistence znamená ztrátu odpovědi či progresi onemocnění po dosažení objektivní remise. Po 42 měsících se sekundární rezistence rozvíjí u 16 % pacientů léčených v časně chronické fázi, u nemocných předléčených IFN- α je to 27 %. S progresí onemocnění se výskyt sekundární remise zvyšuje na 73 % (u akcelerované fáze) a 95 % (u blastické krize) (Guilhot, 2007).

Kontrolní cytogenetické vyšetření je tedy indikováno při jakémkoliv podezření na rozvoj rezistence a při molekulární nebo hematologické progresi onemocnění.

Kromě sledování poklesu hladiny Ph pozitivních buněk se monitoruje také výskyt přídatných chromosomových změn.

3.5 Molekulární patofyziologie CML

Od objevení Ph chromosomu trvalo dalších 30 let, než byla poznána molekulární podstata této cytogenetické změny a objeven fúzní gen *BCR/ABL1*. Jím kódovaná patologická bílkovina, konstitutivně aktivovaná tyrosinkináza Bcr/Abl1, je zodpovědná za patogenezu CML.

Protoonkogen *ABL1* je lidským homologem onkogenu, který byl původně objeven v Abelsonově viru myší leukémie (v-Abl, Abelson murine leukemia virus), právě odtud

pochází jeho jméno. Lidský protoonkogen *ABL1* je dlouhý 52 kb a obsahuje 11 exonů (referenční sekvence NM_005157). Na svém 5'-konci má exony označované jako e1b a e1a. V důsledku alternativního sestřihu se překládá pouze jeden z nich. Výsledný protein Abl1 se tedy vyskytuje ve dvou izoformách (www.genome.cse.ucsc.edu). Je ubiquitní a má molekulovou hmotnost 145 kD. Je DNA-vazebný a je lokalizován v jádře. Jeho N-koncová část obsahuje tři domény, které jsou homologní s doménami onkoproteinu Src. Označují se jako SH1, SH2 a SH3. Doména SH1 má tyrosinkinázovou aktivitu. Domény SH2 a SH3 mají regulační funkce. V C-koncové části proteinu Abl1 jsou domény, z nichž jedna nese signál k jaderné lokalizaci a další zprostředkovávají vazbu na DNA a na aktin.

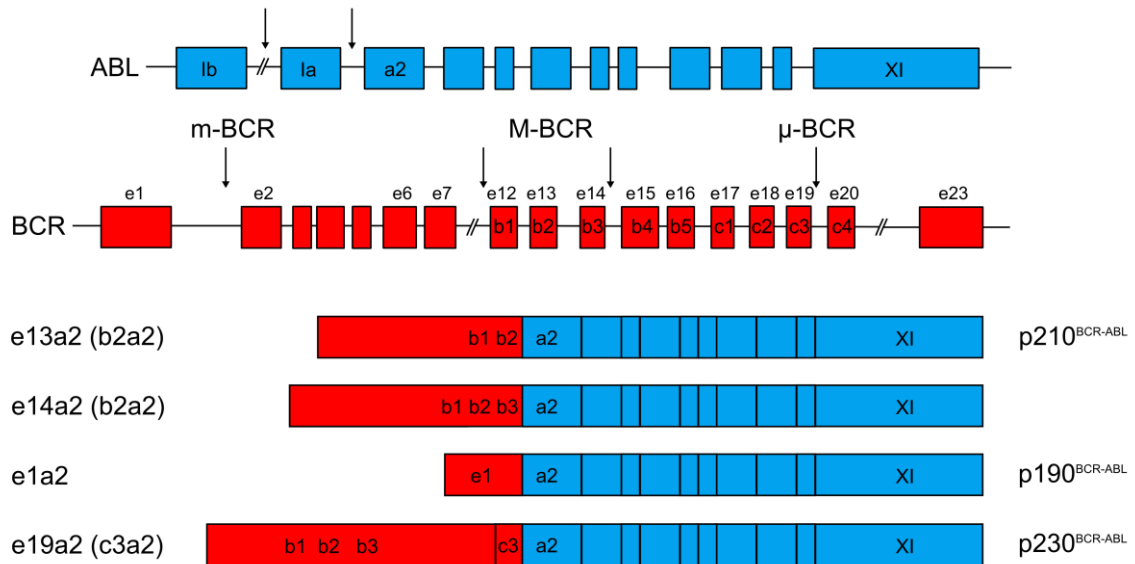
Jaderný Abl1 protein hraje úlohu v reakci buňky na poškození DNA. To vede buď k zástavě buněčného cyklu, nebo ke spuštění programované smrti - apoptózy (Sawyers, 1994). Dále Abl1 protein hraje úlohu v buněčné adhezi.

Protoonkogen *BCR* je dlouhý 13,8 kb a gen obsahuje více než 20 exonů (referenční sekvence NG_009244). Výsledný protein Bcr je ubiquitní, s molekulovou hmotností 160 kD a je lokalizován v cytoplazmě. Jeho hlavní funkcí je pravděpodobně přenos signálů. Tento protein má více strukturních domén. Na jeho N-konci je doména se serin-threonin-kinázovou aktivitou. C-koncová oblast obsahuje doménu aktivující GTPázu, která potlačuje některé funkce proteinu.

V genu *ABL1* dochází ke zlomu, který umožňuje translokaci, mezi exony e1b a a2, v genu *BCR* mohou vznikat zlomy na několika různých místech. Nejčastěji k nim dochází v oblasti M (major), další místo se nachází v oblasti m (minor) a vzácnější je v oblasti μ (mikro). V oblasti major, v závislosti na místě zlomu je druhý exon (a2) genu *ABL1* připojen buď k exonu b2 (místo spojení označujeme b2a2), nebo exonu b3 (místo spojení označujeme b3a2) genu *BCR*. Fúzní gen s konfigurací b2a2 je přepisován do jedné formy mRNA. U spojení b3a2 lze v důsledku alternativního sestřihu nalézt dva transkripty odpovídající jak b2a2, tak b3a2. Molekulová hmotnost fúzního proteinu je 210 kD a značí se p210^{Bcr/Abl1}. Při zlomu v oblasti m (minor) se stává součástí fúzního genu první exon (e1), který je úsekem genu *BCR*. Fúzní gen se označuje e1a2 a molekulová hmotnost fúzního proteinu je 190 kD.

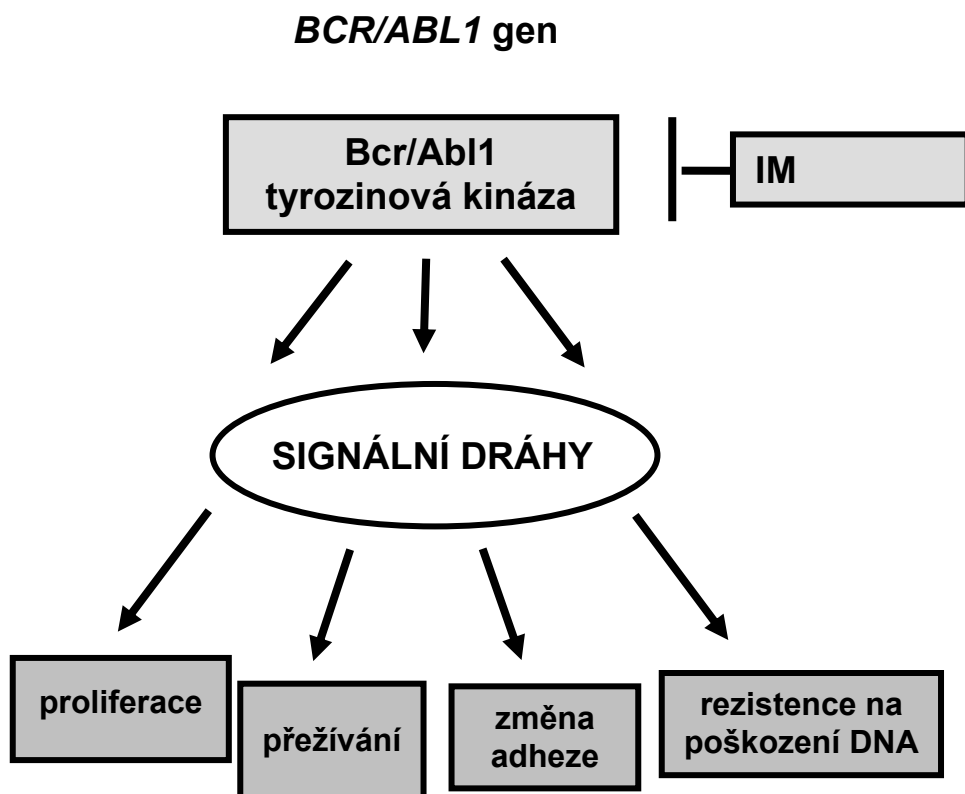
Zlom v oblasti μ (mikro) genu *BCR* je vzácnější. Dochází ke spojení mezi 19. exonem genu *BCR* a a2 (místo spojení označujeme e19a2 nebo c3a2). Výsledný fúzní protein má molekulovou hmotnost 230 kD.

Fúzní geny s konfigurací b2a2 a b3a3 se vyskytují až u 99 % nemocných s CML (Faber, 2010), ostatní typy přestaveb jsou vzácnější (Obrázek 13).



Obrázek 13: Schematické znázornění vzniku tří nejčastějších variant *BCR/ABL1* fúzních genů, resp. Bcr/Abl1 chimérických proteinů. Šipky ukazují místa zlomů na *BCR* a *ABL1* genomické sekvenci. „e“ značí exony *BCR* genu, „a“ značí exony *ABL1* genu. Jako „major“ se označuje zlom, vedoucí k p210; jako „minor“ zlom, vedoucí k p190 a jako „micro“ zlom, vedoucí k vzácné variantě chimérického proteinu p230 (převzato z Faber, 2010).

Fúzní gen *BCR/ABL1* kóduje konstitutivně aktivní Bcr/Abl1 tyrosinovou kinázu (Lugo, 1990). Tato abnormální kináza konstitutivně aktivuje signální dráhy, což na buněčné úrovni vede k nádorové transformaci buňky (Obrázek 14).



Obrázek 14: Signalizace Bcr/Ab1 TK. Bcr/Ab1 TK aktivuje několik signálních drah účastnících se regulace buněčné proliferace, přežití a adheze. Její aktivita také vede ke genomické nestabilitě *BCR/ABL1* pozitivních buněk. (Převzato z Naušová, 2006)

4 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo:

1. Vyšetření souboru pacientů s CML, stanovení frekvence a typu chromosomových změn metodami klasické a molekulární cytogeneticky
2. Analýza a srovnání výsledků léčby na základě nalezených cytogenetických změn
3. Analýza výskytu a významu přídatných chromosomových změn
4. Detailní analýzy zajímavých případů nemocných s CML
5. Statistické vyhodnocení klinického významu nalezených genetických změn

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Soubor pacientů

Vyšetřovaný soubor tvořilo celkem 256 nemocných, diagnostikovaných a léčených na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci v letech 1991 – 2009. CML u nich byla diagnostikována na základě kritérií WHO.

Charakteristika souboru je uvedena v Tabulce 5. Rozdělení nemocných do skupin podle použité terapie ukazuje Tabulka 6. Nejvíce nemocných bylo diagnostikováno v roce 2000, 2003 a 2004 (Graf 1). Z celkového počtu nemocných v současnosti žije 63 % nemocných, 37 % zemřelo (Tabulka 8), celkové přežití nemocných ukazuje Graf 2.

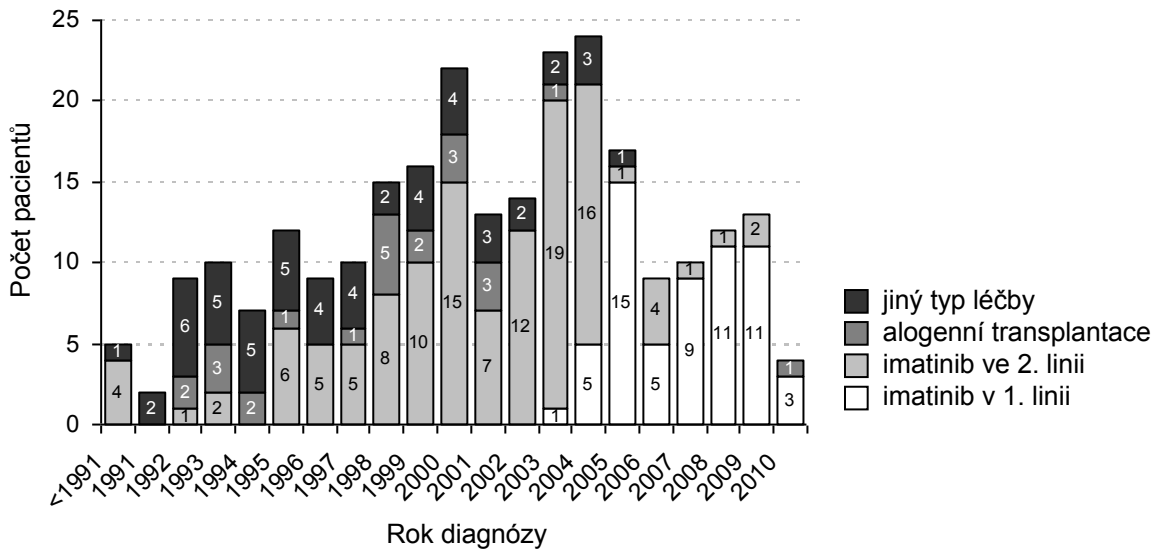
Tabulka 5: Charakteristika souboru nemocných

Pohlaví	<i>N</i>	<i>%</i>
muži	152	59,4 %
ženy	104	40,6 %
Věk		
<20 let	7	2,7 %
20-29 let	24	9,4 %
30-39 let	38	14,8 %
40-49 let	51	19,9 %
50-59 let	78	30,5 %
60-69 let	40	15,6 %
70-79 let	16	6,3 %
≥80 let	2	0,8 %
průměr	49 let	
medián	52 let	
minimum - maximum	16 – 83 let	
Přídavné chromosomové změny		
při dg. CML	<i>N</i>	<i>%</i>
přítomny	44	17,2 %
nepřítomny	193	75,4 %
neznámo	19	7,4 %
Variantní translokace		
	<i>N</i>	<i>%</i>
přítomna	14	5,5 %
nepřítomna	242	94,5 %

Tabulka 6: Stratifikace pacientů do skupin podle typu léčby

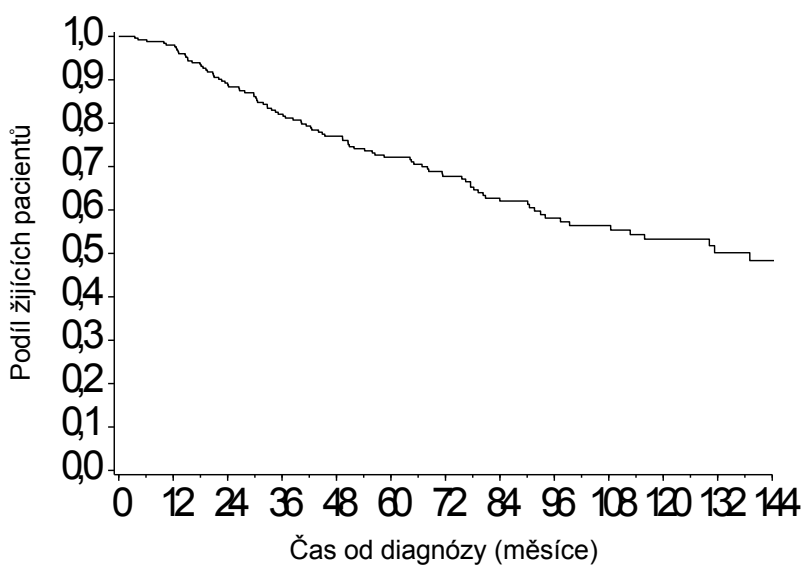
Léčba	<i>N</i>	<i>%</i>
imatinib v 1. linii	60	23,4 %
imatinib ve 2. linii	119	46,5 %
alogenní transplantace	21	8,2 %
jiná léčba	56	21,9 %

Graf 1: Pacienti podle roku stanovení diagnózy a typu léčby



Tabulka 8: Stav pacientů a sledování v čase (N = 256)

Délka sledování (měsíce)	Žijící N = 161 (62,9 %)	Zemřelí N = 95 (37,1 %)	Všichni N = 256 (100 %)
průměr	85,6	52,0	73,1
medián	81,5	41,3	66,9
minimum - maximum	0,0 - 251,1	3,5 - 289,4	0,0 - 289,4



Graf 2: Celkové přežití souboru pacientů (N = 256)

5.2 Metody

Materiálem pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření byly nestimulované buňky kostní dřeně. Celkem 2 ml punktátu kostní dřeně byly vloženy do RPMI-1640 média (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) s 20 % inaktivního bovinního fetálního séra a následně rozděleny na 2 části: pro přímé zpracování a pro 24hodinovou kultivaci při teplotě 37° C v prostředí 5 % CO₂. Kultury byly dále zpracovány podle standardních cytogenetických postupů (Jarosová, 2003). Pro zvýšení počtu buněk ve stádiu metafáze bylo před zpracováním k buněčným suspenzím přidáno 0,1 µg/ml colcemidu (Gibco) na dobu 20 minut. Suspenze byly inkubovány v hypotonickém roztoku s 0,075 M KCl (20 minut), poté následovalo promývání fixačním roztokem Carnoy (methanol:kyselina octová, 3:1). Fixované buněčné suspenze byly buď přímo použity pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření nebo byly zamrazeny při -20° C pro další použití.

5.2.1 Klasická cytogenetická analýza

Buněčné suspenze byly nakapány na SuperFrost skla a obarveny technikou G-pruhování. Bylo hodnoceno nejméně 20 metafází, z toho 10 bylo karyotypováno pomocí softwaru IKAROS (MetaSystems Althusheim, Německo). Chromosomy byly hodnoceny podle kritérií ISCN 2005, u nemocných vyšetřených po roce 2009 podle ISCN 2009 (Shaffer, 2005, 2009). Za abnormální klon byl označen nálezný dvou a více metafází se stejnou strukturální abnormalitou nebo se stejnými nadpočetnými chromosomy a nálezný tří a více metafází s delecí nebo chyběním stejného chromosomu.

5.2.2 Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Klasická metoda FISH byla použita u pacientů s chromosomovou změnou v karyotypu (včetně pacientů s komplexními změnami) k ověření a bližší charakterizaci nalezené změny. Buněčné suspenze byly nakapány na SuperFrost skla a inkubovány v 0,5 mg/ml RNase (Sigma Aldrich) po dobu 30 minut nebo alternativně v roztoku 2xSSC při teplotě 37°C po dobu 30 minut. Skla byla poté omyta roztoky 2xSSC a vysušena vzestupnou

řadou alkoholů (70 %, 80 %, 90 % a 96 %). Denaturace sond a cílové DNA byla provedena podle postupů výrobce sond. Byly použity komerčně dostupné fluorescenční genové a centromerické sondy (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), celochromosomové sondy (MetaSystems a Cambio, Cambridge, Velká Británie), ramenově specifické sondy (MetaSystems) a sondy připravené z BAC (bacterial arteficial chromosome) klonů (viz. kapitola 5.2.2.1). Hybridizace byla provedena podle návodu výrobce sondy a preparáty byly hybridizovány při 37 °C přes noc. Po omytí skel v sérii mycích roztoků 2xSSC/0,1% NP40 a 0,4xSSC/0,3% NP40, byla suchá skla zamontována do roztoku DAPI II (Abbott Molecular) a následně analyzována pomocí fluorescenčního mikroskopu a programu ISIS (Metasystems) (viz kapitola 5.2.5).

5.2.2.1 Příprava BAC sond

Pro přípravu komerčně nedostupných sond v oblastech chromosomových zlomů u detekovaných komplexních aberací byly použity BAC klony získané z knihovny od prof. M. Rocchi z University v Bari, Itálie.

BAC klony byly v naší laboratoři kultivovány za standardních podmínek při 37 °C a přítomnosti selekčního činidla (antibiotikum chloramfenikol ve výsledné koncentraci 12,5 µg/ml kultivačního media). Transportní kultury byly vysety na agarózové plotny a kultivovány přes noc. Jedna kolonie byla odebrána a přeočkována do 4 ml tekutého LB media (Sigma Aldrich) a kultivována 6 hodin. 700 µl této kultury bylo přeneseno do 300 ml glycerolu za účelem vytvoření zásobní kultury, která je dlouhodobě uchována při teplotě -78° C. Ze 4 ml kultury bylo přeočkováno 100 µl do 25 ml tekutého LB media a kultivováno přes noc (celkem 3 x 25 ml kultury). Výsledný objem (75 ml) kultury byl centrifugován a pelet byl použit pro izolaci plazmidové DNA.

Plazmidová DNA byla izolována kitem QIAGEN plasmid midi kit (QIAGEN Hilden, Německo). Kvalita DNA byla ověřena gelovou elektroforézou a koncentrace DNA byla zjištěna přístrojem Nanodrop1000. DNA byla pomocí metody náhodného navázání primeru (random priming, BioPrime Array CGH Genomic Labeling Module; Invitrogen) značena fluorochromy SpectrumGreen nebo SpectrumOrange (Abbott Molecular). K takto označené DNA rozpuštěné v TE pufru byla přidána Cot1 DNA (1 µg/µl) (Invitrogen), byla vysrážena s ethanolem a vysušena. Poté byla sonda rozpuštěna v hybridizačním pufru (50% formamid/2xSSC/10% dextran sulfát/0,1% Tween20/10mM TrisHCl) a aplikována

na připravené sklo s cílovou DNA. Sonda i cílová DNA byly kodenaturovány při 75° C a inkubovány při 37 °C přes noc. Specifita takto připravených sond byla ověřena na normálních metafázních chromosomech.

5.2.3 Metoda mnohobarevné FISH (M-FISH)

Metoda M-FISH byla použita pro přesné určení chromosomových změn u pacientů s komplexním karyotypem (Jarosová, 2003). Preparáty byly hybridizovány 72 hodin s kitem 24Xyte DNA Probe (MetaSystems), hybridizace i posthybridizační mytí probíhalo podle návodu výrobce. Výsledek hybridizace byl vyhodnocen pomocí fluorescenčního mikroskopu a programu ISIS (viz kapitola 5.2.5.).

5.2.4 Metoda komparativní genomové hybridizace (CGH)

Metoda CGH byla provedena u vybraných pacientů s vyšším zastoupením nádorových buněk v kostní dřeni a dostupnou DNA. DNA byla izolována z KD nebo z buněčné suspenze fixované v Carnoy fixačním roztoku metodou standardní fenol/chloroformové extrakce. Získaná genomická DNA byla rozpuštěna v TE pufru a uložena při -20 °C . Nádorová DNA byla označena metodou náhodného navázání primeru (Invitrogen) fluorochromem Spectrum Green (Abbott Molecular). Jako kontrolní DNA byla použita komerčně dostupná genomická DNA (Abbott Molecular). K těmto rozdílně fluorescenčně značeným DNA byla přidána Cot1 DNA (Invitrogen), byly vysráženy s ethanolem a vysušeny. Sonda byla rozpuštěna v hybridizačním pufru (CGH hybridizační pufr, Abbott Molecular) a aplikována na připravené sklo s normálními metafázními chromosomy (Abbott Molecular). Preparáty byly hybridizovány 72 hodiny při 37° C a poté omyty v mycích roztocích 2xSSC/0,1% NP40 a 0,4xSSC/0,3% NP40. Suchá skla byla zamontována do roztoku DAPI II (Abbott Molecular) a následně analyzována pomocí fluorescenčního mikroskopu a programu ISIS (viz kapitola 5.2.5). Hranice normálního nálezu byly stanoveny na 0,75 (dolní hranice) pro ztráty genetického materiálu a 1,25 (horní hranice) pro zmnožení genetického materiálu. Chromosomy a chromosomové oblasti mimo hranice normálního nálezu byly považovány za nebalancované změny v nádorovém genomu. Oblasti telomer a heterochromatinové oblasti byly z analýzy vyloučeny (Jarosová, 2001).

5.2.5 Hodnocení výsledků *in situ* hybridizace

Výsledky *in situ* hybridizace byly hodnoceny pomocí fluorescenčních mikroskopů Olympus, Zeiss (Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA; Carl Zeiss Microscopy, Jena, Německo) vybavených příslušnými fluorescenčními filtry a CCD kamerami a analyzovány pomocí softwaru ISIS (MetaSystems).

U metody FISH s centromerickými a genovými sondami bylo hodnoceno vždy alespoň 300 interfázních jader. Hraniční hodnota pozitivita použitých sond (cut-off level) byla shodná s hodnotou falešné pozitivita uváděné výrobcem dané sondy.

Výsledky metody M-FISH byly zhodnoceny karyotypováním minimálně 10 mitóz.

Pro hodnocení výsledku metodou CGH bylo snímáno a zkaryotypováno minimálně 15 – 20 mitóz, tak aby bylo zhodnoceno minimálně 20 chromosomů každého homologního páru.

5.2.6 Metoda array komparativní genomové hybridizace (aCGH)

Pro metodu aCGH byl použit 1 Mb BAC čip (Leiden University Medical Center, Leiden, Nizozemí) obsahující 3,500 BAC klonů (Wellcome Trust Sanger Institute) vyrobený v Leiden University Medical Center (LUMC) (Knijnenburg, 2005).

Příprava sondy byla provedena s malými úpravami podle Fiegler, 2003. Hybridizace a posthybridizační mytí probíhala s použitím hybridizační stanice Tecan HS400Pro Hybridization Station (Tecan, Mannedorf, Switzerland). Čipy byly naskenovány za pomoci GenePix Professional 4200A scanner (Axon Instruments), primární data byla analyzována GenePix Pro 6.1 softwarem (Axon Instruments), vyhodnocena a statisticky upravena laboratorním excelovým programem (Microsoft Excel 2000). Ztráty a zmnožení genetického materiálu byly definovány jako odchylky \log_2 poměrů intenzit fluorescence z intervalu ± 0.3 .

5.2.7 Metody molekulárně biologické

Celková RNA byla izolována z leukocytů kostní dřeně (periferní krve) dle standardního protokolu (Chomczynski, 1987). RNA byla přepsána do komplementární DNA (cDNA)

pomocí Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) s použitím náhodných hexamerů (Promega, USA).

Vyšetření *BCR/ABL1* transkriptů bylo provedeno pomocí nested RT-PCR (kvalitativní stanovení) (Van Dongen, 1999) nebo pomocí kvantitativní RT-PCR (Q-RT-PCR, kvantitativní stanovení hladiny *BCR/ABL1* transkriptů) (Gabert, 2003).

5.2.8 Detekce Ph chromosomu a přídatných chromosomových změn

K detekci Ph chromosomu a potvrzení diagnózy CML byly použity metody klasické cytogenetické analýzy, k prokázání přítomnosti fúze genů *BCR/ABL1* metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Variantní translokace a komplexní chromosomové přestavby u CML byly prokázány pomocí metody FISH a M-FISH, s použitím speciální směsi sond značených kombinací šesti fluorochromů, která umožňuje analýzu celého genomu v jednom vyšetření.

V případě, že byl k dispozici dostatek materiálu, byla k detekci nebalancovaných chromosomových změn použita metoda CGH, která sice neodhalí přítomnost Ph chromosomu, ale detekuje ztráty případně zmnožení genetického materiálu v leukemických buňkách, pokud tyto změny postihují minimálně 50 % genomu. K analýze celého genomu a určení nebalancovaných změn, které se vyskytovaly alespoň v 25 % byla použita také metoda aCGH.

5.2.9 Statistická analýza

Základní popis sledovaných parametrů byl proveden pomocí frekvenčních tabulek a popisných statistik: průměru, mediánu, minima a maxima. K zobrazení přežívání pacientů dle jednotlivých sledovaných parametrů byly použity Kaplan-Meierovy křivky přežití, ke srovnání skupin v analýze přežití byl použit log-rank test. Pro stanovení statistické významnosti byla uvažována hladina $\alpha=0,05$. Všechny analýzy a grafické výstupy byly provedeny ve statistických softwarech SPSS 12.0.1 for Windows a Statistica 8.0 for Windows.

6 VÝSLEDKY

6.1 Obecná charakteristika souboru

Vyšetřili jsme 256 nemocných s CML, 152 mužů (59,4 %), 104 žen (40,6 %) s mediánem věku 52 let (hraniční hodnoty 16 a 83 roků). IM v 1. linii léčby bylo léčeno 60 (23,4 %) nemocných (58 mužů a 29 žen), v 2. linii léčby 119 (46,5 %) nemocných (56 mužů a 36 žen), jiným typem léčby 56 (21,9 %) nemocných (28 mužů a 28 žen) a TKB podstoupilo 21 (8,2 %) nemocných (10 mužů a 11 žen).

Medián celkového přežití nemocných byl 81,5 měsíců (hraniční hodnoty 0 – 251,1 měsíců) Charakteristiku souboru ukazuje Tabulka 9.

Tabulka 9: Soubor 256 nemocných

počet nemocných	256	
muži	152	
ženy	104	
Věk při dg	medián	52
	rozmezí	16 – 83
léčba	IM 1. linie	60 (23,4 %)
	IM 2. linie	119 (46,5 %)
	TKB	24 (9,4 %)
	Jiný typ léčby	53 (20,7 %)
Celkové přežití	medián	81,5 měsíců
	rozmezí	0 – 251,1 měsíců

6.2 Výsledky cytogenetické analýzy v době diagnózy CML

Klasická cytogenetická analýza byla úspěšná u 221 nemocných, u 10 nemocných (3,9 %) nebyla cytogenetická analýza v době diagnózy provedena, u 18 nemocných (7 %) byla neúspěšná a u 7 nemocných (2,7 %) výsledky cytogenetické analýzy neznáme.

U nemocných, u kterých nebyla cytogenetická analýza provedena v době diagnózy, bylo cytogenetické vyšetření provedeno při následující kontrole léčby, u nemocných s neúspěšnou cytogenetikou bylo provedeno vyšetření metodou FISH. U 7 nemocných, u kterých výsledky cytogenetické analýzy neznáme, byla stanovena diagnóza a zahájena léčba na jiném pracovišti, na Hemato-onkologické klinice v Olomouci bylo cytogenetické vyšetření provedeno v souvislosti se zahájením léčebné studie STI571.

Cytogenetickou analýzou a/nebo metodou FISH byl prokázán vznik Ph chromosomu standardní translokací t(9;22)(q34;q11) u 240 nemocných, u 14 nemocných byla potvrzena variantní translokace t(9;22;V). U dvou nemocných byl cytogenetickou analýzou určen normální karyotyp, fúze *BCR/ABL1* byla prokázána metodou FISH s mikroskopickým obrazem potvrzujícím vznik Ph chromosomu standardní translokací (maskovaný Ph chromosom). Úspěšnost cytogenetického vyšetření, výskyt variantní translokace a přídatných změn ukazuje Tabulka 10.

Tabulka 10: Úspěšnost cytogenetického vyšetření, nález variantní translokace a přídatných změn

Počet nemocných		256
Cytogenetické vyšetření (úspěšnost)	Úspěšná	221 (86,3 %)
	Neprovedeno	10 (3,9 %)
	Neúspěšná	18 (7,1 %)
	Neznáme	7 (2,7 %)
Cytogenetická analýza + FISH	Klasická translokace	242 (94,5 %)
	Variantní translokace	14 (5,5 %)
Cytogenetická analýza + FISH	Pouze Ph	193 (75,4 %)
	Přídatné změny	44 (17,2 %)
	Nevíme	19 (7,4 %)

6.2.1 Ph chromosom vzniklý standardní translokací

Celkem u 237 (92,6 %) nemocných bylo možné cytogenetickou analýzou a/nebo metodou FISH určit, zda jsou v karyotypu nemocných přítomny přídatné změny. Pouze Ph

chromosom bez dalších chromosomových změn v karyotypu byl prokázán u 193 (81 %) nemocných (115 mužů, 78 žen), z toho u 10 (4,2 %) nemocných (8 mužů, 2 ženy) vznikl Ph chromosom variantní translokací.

6.2.2 Variantní translokace

Variantní translokace bez dalších přídatných chromosomových změn byla prokázána klasickou cytogenetickou analýzou a potvrzena metodou FISH u 10 (4,2 %) nemocných. Do variantní translokace byly kromě chromosomů 9 a 22 zapojeny chromosomy 1 (2x), 2, 3, 6 (2x), 7, 9, 2, a 17 (Tabulka 11).

U 4 nemocných (č. 35, 113, 154 a 187) byla prokázána variantní translokace současně s přídatnými chromosomovými změnami, nemocní jsou popsáni v kapitolách popisujících přídatné změny.

Tabulka 11: Nemocní s variantní translokací

Pac. č.	Pohl.	Věk při Dg.	Cytogenetická analýza v době diagnózy onemocnění	Léčba	Léčeb. odp. k posl. datu sledování	Celkové přežití (měsíce)
42	M	53	46,XY,t(7;9;22)(q?22;q34;q11)[15]	IM 1. linie	CMR	58
54	M	55	46,XY,t(9;22;9)(q34;q11;p?21)[15]	IM 1. linie	MMR	14
*64	M	64	46,XY,t(6;9;22)(q?21;q34;q11)[17]	IM 2. linie	MiCyR	EX 35
68	M	59	46,XY,t(9;22;12)(q34;q11;q24)[20]	IM 2. linie	MMR	103
82	M	21	46,XY,t(1;9;22)(q12;q34;q11)[25]	Jiná léčba	NoCyR	EX 24
176	M	43	46,XY,t(9;22;17)(q34;q11;q21)[3]	IM 2. linie	MMR	129
177	Ž	27	46,XX,t(9;22;3)(q34;q11;p?24)[20]	IM 2. linie	MMR	46
*189	M	49	46,XY,t(6;9;22)(p?12;q34;q11)[4]	IM 2. linie	CCyR	123
218	M	65	46,XY,t(1;9;22)(p13;q34;q11)[25]	IM 1. linie	MMR	63
230	Ž	45	46,XX,t(2;9;22)(p?13;q34;q11)[5]	IM 2. linie	CMR	77

* u nemocných se vyvinuly přídatné chromosomové změny v průběhu léčby

EX - exitus

6.2.3 Přídavné chromosomové změny

Z 237 nemocných cytogeneticky a molekulárně cytogeneticky vyšetřených nemocných byly u 44 nemocných (18,6 %) v době diagnózy onemocnění kromě Ph chromosomu prokázány ještě další přídavné chromosomové změny (Tabulka 12): delece 9q u 14 nemocných (31,8 %), trisomie chromosomu 8 u 2 nemocných (4,5 %), přídavný Ph chromosom u 4 nemocných (9,1 %), isochromosom dlouhých ramen chromosomu 17 u dvou 2 nemocných (4,5 %), ztráta chromosomu Y u 4 mužů (9,1 %) a další náhodné změny u 12 nemocných (27,3 %).

U 6 nemocných (2,7 %) byly prokázány komplexní přestavby chromosomů.

Tabulka 12: Přídavné chromosomové změny v době stanovení diagnózy onemocnění

Pac.č.	Pohl.	Věk	Fáze CML před IM	9q-/22q-	Cytogenetická analýza v době diagnózy onemocnění	Léčba	Léčebná odp k posl. datu sledování	Celkové přežití (měsíce)
1	Ž	54	-	-	49,XX,+X,+5,der(9)t(9;22)(q34;q11)+mar[14]/ 49,XX,+X,+5,der(9)t(9;22)(q34;q11)-15,+2mar[2]/ 46,XX,del(5q),der(9)t(9;22)(q34;11)[2]	TKD	CCyR	EX 27
19	Ž	58	-	-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[17] / 66,XX,+2,+3,+5,+der(6),+der(6),+8,t(9;22)(q34;q11),+10,+der(11), +12,+14, +17,+18,+18,+18,+19,+21,+22,+der(22)t(9;22)(q34;q11),+mar,+ring?[7]	Jiná léčba	NoCyR	EX 24
35	Ž	53	AF	-	46,XX,der(9)del(9)(p21)t(9;22;7)(q34;q11;p?12)t(7;9)(?;p?21)[cp8]	IM 2.linie/ TKD	CCyR	EX 14
87	Ž	56	AF	-	46,XX,-2,?(3;5),t(9;22)(q34;q11),+M[cp14]	IM 2.linie	CCyR	EX 71
89	M	44	-	-	46,X,-Y,t(2;11),t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[4]/ 46,XY,del(7p),t(9;22)(q34;q11)[17]/45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11)[9]	TKD	CMR	121
113	M	44	CF	-	47,XY,t(9;22;1;19;6)(q34;q11;p?36;p?13;p?24),+der(22)[32]/ 48,XY,+8,t(9;22;1;19;6)(q34;q11;p?36;p?13;p?24),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[4]	IM 1.linie	NoCyR	EX 4
40	Ž	59	AF	-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[23]/47,XX,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[10]	IM 2.linie/ TKD	NoCyR	EX 51
65	M	25	AF	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[7]/47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[7]	IM 1.linie/ TKD	CMR	76
114	M	53	CF	-	46,XY[1]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[26]/ 47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[2]	IM 1.linie	CMR	31
191	M	54	CF	-	46,XY[1]/ 47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[23]	IM 1.linie	MinimCyR	14
7	M	54	AF	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[28] /47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11)[5]	IM 2.linie	MinorCyR	140
208	M	48	AF	-	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+8[9]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/46,XY[7]	IM 2.linie	CMR	157

Tabulka 12: Přidatné chromosomové změny v době stanovení diagnózy onemocnění (pokračování)

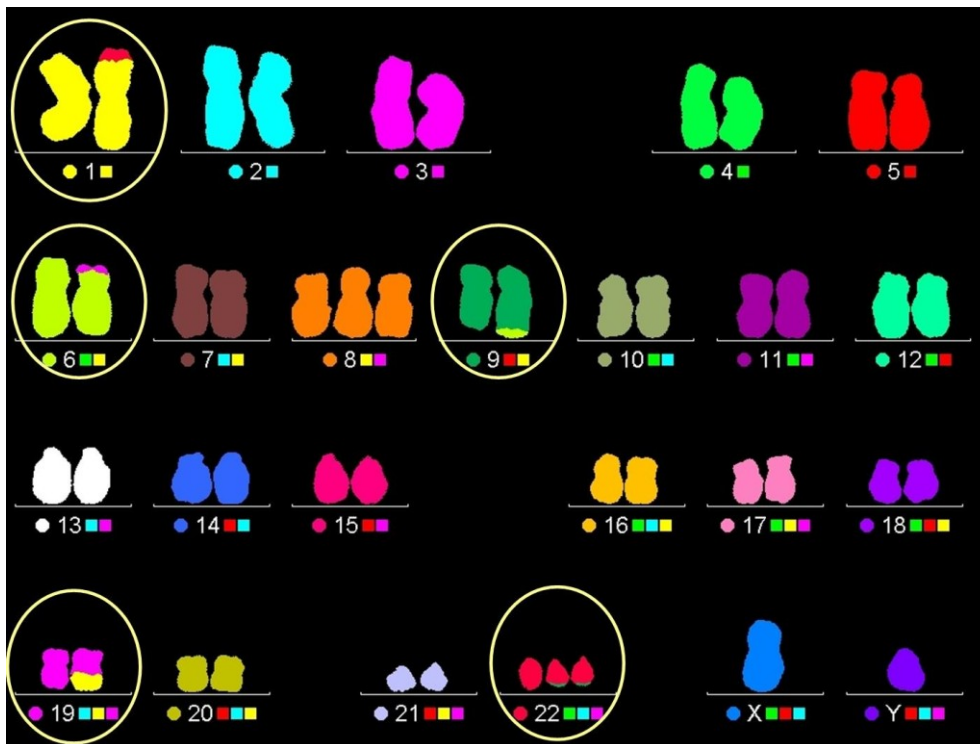
Pac.č.	Pohl.	Věk	Fáze CML před IM	9q-/22q-	Cytogenetická analýza v době diagnózy onemocnění	Léčba	Léčebná odp k posl. datu sledování	Celkové přežití (měsíce)
71	M	58	CF	-	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11)[11]	IM 2.linie/TKD	CMR	110
112	M	67	CF	-	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11)[5]	IM 2.linie	PCyR	79
213	M	57	CF	-	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11)[13]	IM 1.linie	CMR	15
249	M	67	CF	-	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11)[27]	IM 1.linie	PCyR	24
4	M	46	CF	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[15]/46,XY,t(9;22)(q34;q11),i(17q)[5]	IM 2.linie	MinorCyR	EX 84
154	Ž	50	CF	-	46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11),idic(17)(q11)[19]	IM 1.linie	PCyR	58
9	M	27	CF	9q-/22q-	UNSUCCESSFUL / FISH: 93 % fúzi <i>BCR/ABL1</i>	IM 1.linie	MMR	64
161	Ž	21	AF	9q-/22q-	UNSUCCESSFUL / FISH: 84 % fúzi <i>BCR/ABL1</i>	IM 2.linie	MMR	142
52	M	66	CF	9q-/22q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[14]	IM 2.linie	CMR	97
67	M	17	AF	9q-/22q-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[10]	IM 2.linie/TKD	CMR	120
117	Ž	57	CF	9q-/22q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[30]	IM 2.linie	CMR	105
126	M	45	AF	9q-/22q-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6]	IM 2.linie	CMR	81
134	Ž	42	CF	9q-/22q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[30]	IM 2.linie	CCyR	127
156	Ž	68	-	9q-/22q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[21]	jiná léčba	MinimCyR	EX 21
187	M	52	CF	9q-/22q-	46,XY,t(9;22;12)(q34;q11;q?13)[6]	IM 1.linie	CCyR	21
60	Ž	46	CF	9q-	UNSUCCESSFUL / FISH: 57 % fúzi <i>BCR/ABL1</i>	IM 2.linie	CMR	124
81	Ž	47	CF	9q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[25]	IM 2.linie	MMR	73
119	M	34	CF	9q-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]	IM 2.linie	CCyR	90
215	M	71	AF	9q-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[7]/46,XY,del(6q),t(9;22)(q34;q11)[3]	IM 2.linie	PCyR	EX 131

Tabulka 12: Přídavné chromosomové změny v době stanovení diagnózy onemocnění (pokračování)

Pac.č.	Pohl.	Věk	Fáze CML před IM	9q-/22q-	Cytogenetická analýza v době diagnózy onemocnění	Léčba	Léčebná odp k posl. datu sledování	Celkové přežití (měsíce)
219	M	23	AF	22q-	46,XY[20] / FISH: 87 % fúzí <i>BCR/ABL1</i>	IM 1.linie/ TKD	CMR	57
226	M	53	CF	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[15]/46,XY,?der(1),t(9;22)(q34;q11)[5]	IM 1.linie	MMR	55
11	Ž	37	CF	-	46,XX[15]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)t(9;22)(q?21;q?12)[8]	IM 1.linie	MMR	15
109	Ž	59	AF	-	46,XX,dup(2p11pter),t(9;22)q34;q11[15]	IM 1.linie	CCyR	24
25	M	54	CF	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/46,XY,del(6q),t(9;22)(q34;q11)[8]	IM 2.linie	PCyR	98
206	M	50	CF	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/47,XY,t(9;22)(q34;q11),+mar[2]	IM 1.linie	MMR	48
209	Ž	66	CF	-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[8]	IM 2.linie	CMR	98
45	M	54	BF	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[14]/46,XY,inv(7),t(9;22)(q34;q11)[7]	IM 1.linie	PCyR	EX 10
143	M	49	-	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)t(1;5)(q?32;q33)[30]	Jiná léčba	NoCyR	EX 30
53	M	66	-	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11),der(19)t(17;19)(q?13;p?13)[25]	Jiná léčba	NoCyR	EX 68
93	Ž	54	AF	-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[24]/46,XX,t(1;6)(q?36;q?25),t(9;22)(q34;q11)[5]	IM 2.linie/ TKD	NoCyR	EX 20
44	M	34	-	-	46,XY,t(9;22)(q34;q11),t(3;14)(q26;q24)[9]	Jiná léčba	CCyR	EX 33
258	Ž	52	AF	-	46,XX,add(1q),t(9;22)(q34;q11)[2]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)[5]	IM 1.linie	MinimCyR	EX 67

6.2.3.1 Komplexní přestavby karyotypu

Komplexní chromosomové přestavby byly při stanovení diagnózy onemocnění detekovány u 6 nemocných (2,7 %), 4 žen a 2 mužů, z 221 cytogeneticky úspěšně vyšetřených. U dvou nemocných (pac. č. 35 a 113) vznikl Ph chromosom jako důsledek variantní translokace, u nemocného č. 113 bylo do variantní translokace zapojeno 5 chromosomů (Obrázek 15).



Obrázek 15: M-FISH u nemocného č. 113 :

48,XY,+8,t(9;22;1;19;6)(q34;q11;p?36;p?13;p?24),+der(22)

U tří nemocných byl součástí komplexních přestaveb přídavný Ph chromosom - u pacienta č. 113 (obrázek 15) společně s trisomií chromosomu 8, u pacienta č. 89 společně se ztrátou chromosomu Y a další translokací t(2;11)(q?;q?) a u poslední nemocné (č. 19) byl přídavný Ph chromosom detekován v klonu s hyperdiploidií. U nemocné č. 35 metoda M-FISH prokázala přítomnost derivovaného chromosomu der(9), který vznikl komplexní traslokací t(7;9;22) a druhá, nezávislá translokace zahrnovala krátká ramena stejného derivovaného chromosomu 9, t(7;9)(?;p?21), za současné ztráty oblasti 9p21.

Více jak jednou byly do komplexních přestaveb zahrnuty chromosomy 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 a 19. Pouze jeden patologický klon byl nalezen u dvou nemocných (č. 35 a 87), u 4

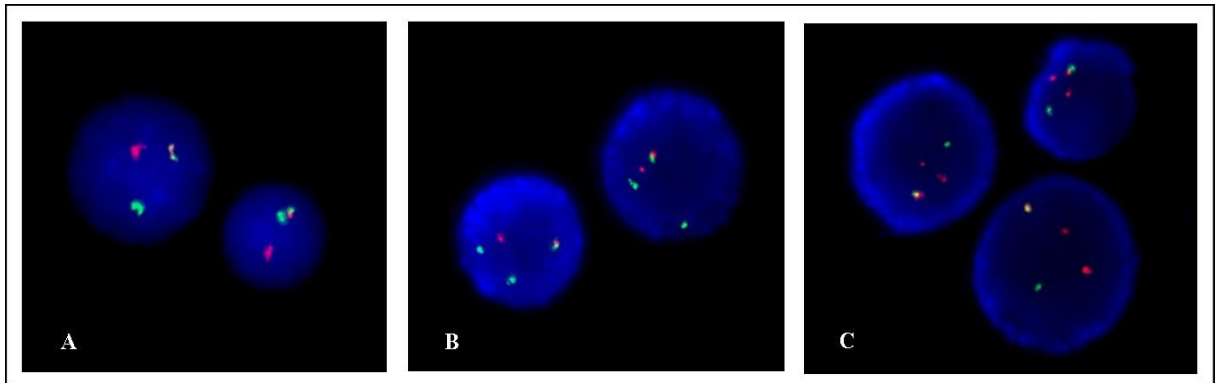
nemocných došlo ke klonální evoluci s přítomností více patologických klonů – dva patologické klony byly prokázány u 2 nemocných (č. 19 a 113) , tři patologické klony u dalších 2 nemocných (pac. č. 1 a 89). Popis nalezených chromosomových změn uvádí Tabulka 13.

Tabulka 13: Komplexní přestavby v době stanovení diagnózy onemocnění

Pac. č.	Pohl.	Věk při Dg	Cytogenetiká analýza v době diagnózy onemocnění	Léčba	Léčebná odp. k posl. datu sledování	Celkové přežití (měsíce)
1	Ž	54	49,XX,+X,+5,der(9)t(9;22)(q34;q11)+mar[14]/ 49,XX,+X,+5,der(9)t(9;22)(q34;q11)-15,+2mar[2]/ 46,XX,del(5q),der(9)t(9;22)(q34;11)[2]	TKD	CCyR	EX 27
19	Ž	58	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[17]/ 66,XX,+2,+3,+5,+6q-?,+6q,+8,t(9;22)(q34;q11),+10,+11p+,+12,+14,+17, +18,+18,+18,+19,+21,+22,+der(22)t(9;22)(q34;q11),+mar,+ring?[7]	jiná léčba	NoCyR	EX 23
35	Ž	53	46,XX,der(9)del(9)(p21)t(9;22;7)(q34;q11;p?12)t(7;9)(?:p?21)[cp8]	IM 2.linie/TKD	CCyR	EX 15
87	Ž	56	46,XX,-2,?t(3;5),t(9;22)(q34;q11),+mar[cp14]	IM 2.linie	CCyR	EX 71
89	M	44	46,X,-Y,t(2;11),t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[4]/ 46,XY,del(7p),t(9;22)(q34;q11)[17]/ 45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11)[9]	TKD	MMR	120
113	M	44	47,XY,t(9;22;1;19;6)(q34;q11;p?36;p?13;p?24),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[32]/ 48,XY,+8,t(9;22;1;19;6)(q34;q11;p?36;p?13;p?24),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[4]	IM 1.linie	NoCyR	EX 4

6.2.3.2 Delece 9q

Z celkového počtu 256 nemocných v souboru byla u 218 nemocných k detekci fúze *BCR/ABL1* použita sonda LSI BCR/ABL (Dual Color Dual Fusion, Abbott Molecular), pomocí níž je možné detekovat delecí na der(9) i der(22), 38 nemocných bylo vyšetřeno pomocí sondy LSI BCR/ABL Dual Color Extra Signal, která detekuje pouze delecí na der(9) nebo sondou LSI BCR/ABL Dual Color, jejíž konstrukce nedovoluje delecí prokázat. Jednalo se o nemocné, kteří byli diagnostikováni ještě v době, kdy sonda DC DF nebyla komerčně dostupná. Těchto 38 nemocných není do hodnocení delecí zahrnuto. Delece 9q byla prokázána celkem u 14 nemocných (6,4 %) – 8 mužů a 6 žen (Tabulka 14). **Cytogenetické vyšetření** bylo u 3 nemocných (21,4 %) neúspěšné, u 9 nemocných (64,3 %) prokázalo přítomnost Ph chromosomu v karyotypu jako výsledek klasické translokace t(9;22)(q34;q11), u jednoho nemocného (7,1 %) (č. 187) vznikl Ph chromosom jako důsledek variantní translokace t(9;22;12). Jeden nemocný (7,1 %) (č. 219) měl konvenčním pruhováním prokázaný normální karyotyp. Jedná se o případ nálezu normálního karyotypu bez Ph chromosomu, ale s fúzí *BCR/ABL1*, která byla prokázána metodou FISH s lokusově specifickou sondou, kdy došlo k inserci 3' oblasti genu ABL do genu BCR a vzniku fúzního genu. U všech nemocných s delecí 9q byla fúze *BCR/ABL1* potvrzena metodou **FISH** s lokusově specifickou sondou BCR/ABL (Dual Color Dual Fusion, Abbott Molecular). U 9 nemocných (4,1 %) byla prokázána delecí na der(9) i der(22) s mikroskopickým obrazem - jeden signál fúzní, jeden zelený, jeden červený: 1F1G1R (Obrázek 16A), delecí pouze na der(9) se signály 1F2G1R (Obrázek 16B) byla detekována u 4 nemocných (1,8 %) a delecí pouze na der(22) se signály 1F1G2R (Obrázek 16C) u jednoho nemocného (0,5 %). Samostatná delecí na der(22) byla prokázána u nemocného s normálním karyotypem (č. 219), u kterého fúze *BCR/ABL1* vznikla jako důsledek inserce 3' oblasti genu *ABL1* do genu *BCR*.



Obrázek 16 A,B,C: Typy delecí prokázané metodou iFISH se sondou LSI BCR/ABL DC DF (Abbott Molecular).

A: 1F1G1R – delece 9q-/22q-. **B:** 1F2G1R – delece 9q-. **C:** 1F1G2R- delece 22q

Tabulka 14: Nemocní s delecí 9q

Pac.č.	Pohl.	Věk při Dg.	Typ delece	Vstupní CY/FISH	Cytog. zm. při léčbě klon Ph+/-	Typ cytog. změny při léčbě	Léčba	nejlepší odp. na IM/DAS	Léčebná odp. k posl.datu sledování	Celkové přežití (měsíce)
9	M	27	9q-/22q-	UNSUCCESSFUL / 93 % fúzí	-		IM 1.linie/TKD/DAS	CCyR	MMR	64
161	Ž	21	9q-/22q-	UNSUCCESSFUL / 84 % fúzí	-		IM 2.linie	CCyR	MMR	97
67	M	17	9q-/22q-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[10]	Ph+ klon	i(17q)	IM 2.linie/TKD	CCyR	CMR	142
117	Ž	57	9q-/22q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[30]	-		IM 2.linie	CCyR	CMR	120
126	M	45	9q-/22q-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6]	-		IM 2.linie/DAS	CCyR/CCyR	CMR	81
134	Ž	42	9q-/22q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[30]	-		IM 2.linie	CCyR	CCyR	127
156	Ž	68	9q-/22q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[21]	-		Jiná léčba	Nehodnoceno	minimal CyR	EX 5
52	M	66	9q-/22q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[14]	-		IM 2.linie	CCyR	CMR	97
187	M	52	9q-/22q-	46,XY,t(9;22;12)(q34;q11;q?13)[6]	-		IM 1.linie	CCyR	CCyR	21
60	Ž	46	9q-	UNSUCCESSFUL / 57 % fúzí	-		IM 2.linie	CCyR odp.	CMR	124
81	Ž	47	9q-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[25]	-		IM 2.linie	CCyR	MMR	73
119	M	34	9q-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]	-		IM 2.linie	CCyR	MMR	90
215	M	71	9q-	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[7]/ 46,XY,del(6q),t(9;22)(q34;q11)[3]	Ph- klon	13q- (CLL)	IM 2.linie	CCyR	PCyR	EX 121
219	M	23	22q-	46,XY[20] / 87 % fúzí	-		IM 1.linie/TKD	PCyR	CMR	57

6.2.3.3 Ztráta chromosomu Y u mužů

Ztráta chromosomu Y byla prokázána u 5 nemocných (Tabulka 12), u 4 z nich jako samostatná změna v Ph pozitivním klonu, u jednoho (pac. č. 89) jako součást komplexních přestaveb.

6.2.3.4 Trisomie chromosomu 8

Trisomie chromosomu 8 byla prokázána u 3 nemocných (Tabulka 12). Dvakrát jako jediná změna k Ph chromosomu (pac. č. 7 a 208), jednou v rámci komplexních přestaveb u nemocného č.113 (Obrázek 15).

6.2.3.5 Další přídatné chromosomové změny

Kromě již popsaných přídatných změn byly prokázány další přídatné chromosomové změny u 12 nemocných (pac. č. 11, 25, 44, 45, 53, 93, 109, 143, 206, 209, 226 a 258). Jednalo se o ojedinělé změny, vícekrát se neopakující (Tabulka 12).

6.3 Výsledky cytogenetické analýzy v průběhu léčby

Přídatné chromosomové změny byly v průběhu léčby nalezeny u 39 nemocných (15,2 %) (Tabulka 15). Z nich 27 (69,2 %) mělo při diagnóze pouze Ph chromosom, u 6 (15,4 %) nebyla cytogenetická data při stanovení diagnózy známa a 6 nemocných (15,4 %) mělo přídatné změny již při diagnóze onemocnění.

U 27 (69,2 %) z 39 nemocných se přídatné změny vyvinuly v Ph pozitivním klonu, u 11 nemocných (28,2 %) v Ph negativním, u 1 nemocné (2,6 %) (č. 129) nebylo možné určit, v kterém klonu k vývoji změny došlo, u nemocné došlo k extramedulárnímu relapsu s postižením lymfatických uzlin a vyšetření pomocí iFISH prokázalo trisomii chromosomu 8 hybridizací na histologickém řezu z parafinového bločku uzliny.

Výsledky cytogenetického sledování u 35 nemocných bez vstupní cytogenetiky prokázaly přídatné chromosomové změny vyvinuté v průběhu léčby u 10 (28,6 %) nemocných. (Tabulka 16)

Tabulka 15 : Nemocní s přidatnými chromosomovými změnami v průběhu léčby

Pac. č.	Pohl.	Věk při Dg	Fáze CML před IM	Cytogenetická analýza/FISH v průběhu léčby onemocnění	Příd. změny klon Ph+/Ph-	Léčba	Léčebná odpověď	Celkové přežití
21	M	49	AF	46,XY[17]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[5]/ 46,XY,der(8)t(1;12;8)(p?32;p?13;q24)del(12)(p13),t(9;22)(q34;q11)[5]	Ph+	IM 2.linie	MMR	97
30	Ž	70	-	46,XX,t(9;22)(q34;q11),t(3;5)(q12;q12;q23)[6]	Ph+	Jiná léčba	NoCyR	EX 13
31	Ž	33	-	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[19]/46,XX,der(1)t(1;?),der(2)t(2;?),t(9;22)(q34;q11)[3]	Ph+	Jiná léčba	NoCyR	EX 65
41	Ž	17	AF	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[12]/47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11)[3]	Ph+	IM 2.linie	PCyR	251
64	M	64	CF	45,XY,dic(7;12)(p11;p11),t(6;9;22)(q?21;q34;q11),i(9)(q11)[11]	Ph+	IM 2.linie	MinimCyR	EX 35
65	M	25	AF	47,XY,t(9;22)(q34;q11),der(20)t(2;20)(?;p?12),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[cp9]	Ph+	IM 2.linie	CMR	76
67	M	17	AF	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[16]/46,XY,t(9;22)(q34;q11),i(17q)[4]	Ph+	IM 2.linie	CMR	120
76	M	53	-	49,XY,+8,+12,+21,t(9;22)(q34;q11)[20]	Ph+	Jiná léčba	NoCyR	EX 42
79	M	66	CF	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[10]	Ph+	IM 1.linie	NoCyR	EX 21
132	M	57	AF	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6]/48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[2]	Ph+	IM 2.linie	MinimCyR	EX 38
140	Ž	54	AF	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[26]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)t(9;13)(p?12;q?13)[4] FISH: 13q-	Ph+	IM 2.linie	MinimCyR	EX 108
154	Ž	50	CF	46,XX[2]/46,XY,t(1;9;22)(q42;q34;q11)[2]/ 46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11),t(3;7)(q?26;q?22)[26]	Ph+	IM 1.linie	PCyR	24
167	M	55	CF	47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11)[10]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[19]	Ph+	IM 2.linie	NoCyR	EX 93
169	M	46	CF	FISH : 2 fúze <i>BCR/ABL1</i>	Ph+	IM 2.linie	PCyR	EX 68
181	M	53	AF	tetrasomie : 4 fúze <i>BCR/ABL1</i> , 4 sig. <i>BCR,ABL1</i> , 4 kopie CEP 8 a CEP 9	Ph+	IM 2.linie	MinorCyR	EX 45

Tabulka 15 : Nemocní s přídatnými chromosomovými změnami v průběhu léčby (pokračování)

Pac. č.	Pohl.	Věk při Dg	Fáze CML před IM	Cytogenetiká analýza/FISH v průběhu léčby onemocnění	Příd. změny klon Ph+/Ph-	Léčba	Léčebná odpověď	Celkové přežití
204	Ž	27	-	46,XX[19]/47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11)[8]/ 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[15]/46,XX,t(X;7)(q13;p15),t(9;22)(q34;q11)[8]	Ph+	Jiná léčba	MMR	219
210	Ž	49	CF	46,XX[15]/47,XX,t(9;22)(q34;q11),+mar[2]	Ph+	IM 1.linie	CMR	61
213	M	57	CF	FISH: +der(16)inv(16), 11q-, 13q-	Ph+	IM 1.linie	CMR	15
238	M	19	-	47-48,XY,+4?,+8?,t(9;22)(q34;q11)[7]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[17]	Ph+	TKB	CMR	155
241	M	50	CF	46,XY[25]48,XY,+8,t(9;22),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[3]	Ph+	IM 2.linie	CCyR	81
246	Ž	69	BZ	46,XX,t(9;22)(q34;q11),der(17)t(?;17)(?;p?11)[3]/ 45,XX,-5,t(9;22)(q34;q11),der(17)t(5;17)(?;p?11)[3] / FISH: 60 % 17p-	Ph+	IM 2.linie	NoCyR	EX 97
250	Ž	44	-	47,XX,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[5]	Ph+	Jiná léčba	NoCyR	EX 28
255	M	29	CF	46,XY[18]/47,XY,t(9;22),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[2]	Ph+	IM 2.linie	MinimCyR	EX 145
256	Ž	39	AF	44,XX,t(9;22)(q34;q11),der(7)?del(7p),-12,-17,-18,+mar[6]/ 45,XX,t(9;22)(q34;q11),-17,-18,+mar[6]	Ph+	IM 2.linie	NoCyR	EX 139
260	Ž	35	AF	46,XX,der(X),t(9;22)(q34;q11)[5]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)[14]/ 47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11)[2]	Ph+	IM 2.linie	MinimCyR	EX 289
261	M	53	AF	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+19[2]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)[28]	Ph+	IM 2.linie	NoCyR	EX 116
263	M	20	AF	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[24]/46,XY,der(7),t(9;22)(q34;q11),der(12)[4]/ 47,XY,der(7),-8,t(9;22)(q34;q11),der(12),-13,+3mar[2]	Ph+	IM 2.linie	NoCyR	EX 52
90	M	52	CF	47,XY,+mar[2]/46,XY[22]	Ph+	IM 2.linie	CCyR	131

Tabulka 15 : Nemocní s přídatnými chromosomovými změnami v průběhu léčby (pokračování)

Pac. č.	Pohl.	Věk při Dg	Fáze CML před IM	Cytogenetická analýza/FISH v průběhu léčby onemocnění	Příd. změny klon Ph+/Ph-	Léčba	Léčebná odpověď	Celkové přežití
94	Ž	49	AF	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[9]/47,XX,+8[11]	Ph-	IM 2.linie	MMR	96
97	M	39	CF	46,XY[24]/47,XY,+8[4]	Ph-	IM 1.linie	MMR	69
162	Ž	48	CF	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[6] / 47,XX,+8[13] /46,XX [1]	Ph-	IM 2.linie	PCyR	106
189	M	49	CF	46,XY[14]/46,XY,t(6;9;22)(p?12;q34;q11)[3]/47,XY,+8[2]	Ph-	IM 2.linie	CCyR	123
129	Ž	52	CF	FISH: +8 (78 %)	Nevíme	IM 2.linie	PCyR	91
131	M	64	CF	FISH: -Y (7 %)	Ph-	IM 1.linie	CMR	64
200	M	62	CF	FISH: -Y (9 %)	Ph-	IM 2.linie	PCyR	118
206	M	50	CF	FISH: -Y (9 %)	Ph-	IM 1.linie	MMR	48
128	M	77	CF	FISH: -Y (7 %)	Ph-	IM 1.linie	CCyR	40
147	M	68	CF	46,XY[2]/47,XY,+12[28]	Ph-	IM 1.linie	MMR	23
215	M	71	AF	FISH: 13q-	Ph-	IM 2.linie	PCyR	131

Tabulka 16: Chromosomové změny detekované v průběhu onemocnění u nemocných bez vstupních cytogenetických dat

Pac. č.	Pohl.	Věk	Fáze CML před IM	Cytogenet. analýza při Dg.	FISH při Dg (% fúzí <i>BCR/ABL1</i>)	Cytogenetická analýza při léčbě	Léčba	Odpověď na léčbu	Celkové přežití
31	M	27	-	Nevyšetřeno		46,XX,t(9;22)(q34;q11)[19] 46,XX,der(1)t(1;?),der(2)t(2;?),t(9;22)(q34;q11)[3]	Jiná léčba	NoCyR	EX 65
32	M	59	CF	Nevyšetřeno	89%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 2.linie	CMR	EX 92
79	Ž	33	CF	Nevyšetřeno	88%	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[10]	IM 1.linie	NoCyR	EX 21
122	Ž	56	AF	Nevyšetřeno	92%	Pouze FISH	IM 1.linie	PCyR	12
129	Ž	56	CF	Nevyšetřeno	77%	FISH na parafinovém řezu: +8 (78 %)	IM 2.linie	PCyR	91
145	M	78	-	Nevyšetřeno	54%	ND	Jiná léčba	MinorCyR	EX 30
200	M	55	CF	Nevyšetřeno		FISH : 1 % fúzí -Y (9 %)	IM 2.linie	PCyR	118
204	Ž	71	-	Nevyšetřeno		46,XX,t(9;22)(q34;q11)[15]/47,XX,t(9;22)(q34;q11),+8/[8] 46,XX,t(X;7)(q13;p15),t(9;22)(q34;q11)[8]/46,XX[19]	Jiná léčba	MMR	219
211	Ž	46	CF	Nevyšetřeno	90%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 2.linie	MinorCyR	EX 16
233	M	38	BF	Nevyšetřeno		Bez přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	MinorCyR	67
9	M	21	CF	Neúspěšná	93% (9q-/22q-)	Bez dalších přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	MMR	64
15	M	66	CF	Neúspěšná	94%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 2.linie	NoCyR	84
33	M	55	CF	Neúspěšná	61%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 2.linie	MinorCyR	131
34	Ž	52	BF	Neúspěšná	86%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	MinimCyR	EX 13
36	Ž	38	CF	Neúspěšná	94%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 2.linie	MMR	EX 92
50	Ž	81	-	Neúspěšná	84%	Bez přídatných chromosomových změn	Jiná léčba	NoCyR	EX 23
60	Ž	21	CF	Neúspěšná	86% (9q-)	Bez dalších přídatných chromosomových změn	IM 2.linie	CMR	124
62	M	59	-	Neúspěšná	95%	Bez přídatných chromosomových změn	TKD	CMR	EX 6

Tabulka 16: Chromosomové změny detekované v průběhu onemocnění u nemocných bez vstupních cytogenetických dat (pokračování)

Pac. č.	Pohl.	Věk	Fáze CML před IM	Cytogenet. analýza při Dg.	FISH při Dg (% fúzí <i>BCR/ABL1</i>)	Cytogenetická analýza při léčbě	Léčba	Odpověď na léčbu	Celkové přežití
69	M	73	BF	Neúspěšná	62%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	CMR	80
130	M	55	AF	Neúspěšná	89%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	CMR	90
161	Ž	53	AF	Neúspěšná	84% (9q-/22q-)	Bez dalších přídatných chromosomových změn	IM 2.linie	MMR	142
165	M	62	-	Neúspěšná	87%	Bez přídatných chromosomových změn	Jiná léčba	CMR	92
166	Ž	27	-	Neúspěšná	75%	ND	Jiná léčba	NoCyR	EX 45
167	M	66	CF	Neúspěšná	96%	47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11)[10]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[19]	IM 2.linie	NoCyR	EX 93
170	M	62	CF	Neúspěšná	13%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	MMR	29
212	M	37	CF	Neúspěšná	96%	Bez přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	CMR	EX 40
247	M	48	-	Neúspěšná	75%	ND	Jiná léčba	NoCyR	99
252	Ž	73	-	Neúspěšná	75%	ND	Jiná léčba	PCyR	EX 10
256	Ž	39	AF	Nevíme		44,XX,der(7)?del(7p),t(9;22)(q34;q11),-12,-17,-18,+mar[6]/45,XX,t(9;22)(q34;q11),-17,-18,+mar[6]	IM 1.linie	NoCyR	EX 139
257	Ž	45	AF	Nevíme		Bez přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	PCyR	EX 79
260	Ž	35	AF	Nevíme		46,XX,der(X),t(9;22)(q34;q11)[5]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)[14]/47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11)[2]	IM 1.linie	MinorCyR	EX 289
261	M	53	AF	Nevíme		47,XY,t(9;22)(q34;q11),+19[2]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)[28]	IM 2.linie	NoCyR	EX 116
262	M	23	AF	Nevíme		Bez přídatných chromosomových změn	IM 1.linie	NoCyR	13
263	M	20	AF	Nevíme		46,XY,t(9;22)(q34;q11)[24]/46,XY,der(7),t(9;22)(q34;q11),der(12)[4]/47,XY,der(7),-8,t(9;22)(q34;q11),der(12),-13,+3mar[2]	IM 2.linie	NoCyR	EX 52
264	M	61	AF	Nevíme		FISH : 43 % fúzí	IM 2.linie	MinorCyR	EX 64

6.3.1 Přídavné chromosomové změny u nemocných s variantní translokací

U nemocných s variantní translokací byly přídavné změny vzniklé během léčby prokázány u 3 nemocných - č. 64, 189 a 154 (Tabulka 15). U dvou z nich (č. 64 a č. 189) vznikl Ph chromosom variantní translokací t(6;9;22). U nemocného č. 64 byly metodou M-FISH prokázány komplexní přestavby karyotypu související s progresí onemocnění :

45,XY,dic(7;12)(p11;p11),t(6;9;22)(q?21;q34;q11),i(9)(q11)[11]

U nemocného č. 189 byla prokázána 70 měsíců od stanovení diagnózy +8 v Ph negativním klonu: 46,XY[14]/46,XY,t(6;9;22)(p?12;q34;q11)[3]/47,XY,+8[2]

U třetí nemocné (pac. č. 154) byl pozorován několikastupňový klonální vývoj karyotypu, který byl zachycen při opakovaných vyšetřeních v časovém odstupu. Vzhledem ke komplexnosti tohoto klonálního vývoje je nález presentován jako kazuistika.

Kazuistika – pacientka č. 154

Jedná se o 50 letou pacientku, které byla Ph⁺ CML diagnostikována v říjnu 2008. Pacientka byla v chronické fázi onemocnění, s vysokou leukocytózou ($289 \times 10^9/l$), výraznou splenomegalií a vysokým rizikem dle Sokala a Euro skóre. U nemocné byla zahájena cytoredukční terapie Litalirem s dobrým efektem, regresí splenomegalie a ústupem klinických obtíží. Cytogenetickým vyšetřením a molekulárně cytogenetickým vyšetřením (FISH) byla prokázána komplexní translokace t(1;9;22) s přídavnou chromosomovou změnou – isodicentrickým chromosomem dlouhých ramen chromosomu 17 – idic(17q) (Tabulka 12). Pacientka byla zařazena do studie CA180056, otevřené multicentrické randomizované studie, srovnávající léčbu imatinibem ve standardní dávce (400 mg/den) a dasatinibem v léčbě pacientů s nově diagnostikovanou CML v chronické fázi. Nemocná byla randomizována pro léčbu IM.

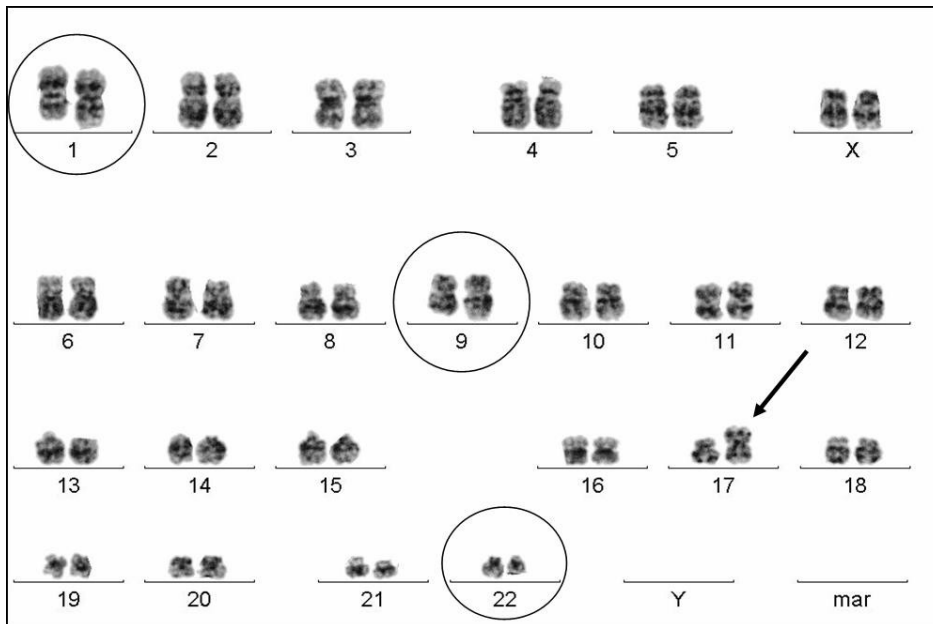
Po 14denní cytoredukční terapii byla zahájena léčba preparátem Glivec, vzhledem k leukopenii, neutropenii a trombopenii dávkou 100 mg/den, po týdnu byla dávka zvýšena na 200 mg/den a po dalších 14 dnech pokračovala standardním dávkováním 400 mg/den po dobu 5 měsíců – do dubna 2009, kdy byl metodou FISH prokázán procentuální nárůst fúzí *BCR/ABL1* (v lednu 14 %, v dubnu 24 %) a léčba byla pro neutropenii a trombopenii přerušena, nemocné byly aplikovány růstové faktory a hematinika. Kontrolní cytogenetické vyšetření prokázalo přítomnost Ph chromosomu ve všech hodnocených

mitózách, nebyla prokázána přítomnost původního Ph pozitivního klonu s idic(17q). V červnu 2009 byla ukončena účast ve studii pro cytogenetickou rezistenci, nemocná byla dále léčena preparátem Glivec v dávkování 400 mg/den a Neupogenem. V září 2009 (cca rok od stanovení diagnózy) byl cytogenetickým vyšetřením zachycen klonální vývoj karyotypu, byla prokázána nová chromosomová aberace v Ph pozitivním klonu - translokace t(3;7). Terapie Glivecem byla ukončena v listopadu 2009 pro selhání léčby a pacientka byla převedena na léčbu tyrosinkinázovým inhibítorem 2. generace – Tasignou (Nilotinib) v dávkování 400 mg/den. Léčba byla intermitentně přerušována pro hematologickou toxicitu, s nezbytností podání G-CSF a transfúzí. Po měsíci terapie Tasignou prokázalo vyšetření metodou FISH 36 % fúzí *BCR/ABL1* a dále trisomii chromosomu 8 v 7 % hodnocených interfázních jádrech, která však při následných vyšetřeních nebyla zachycena. Nemocná pokračovala v léčbě Tasignou s nízkými léčebnými dávkami, přerušovanou pro trombopenii a anémii s nutností podávání transfúzí a růstových faktorů. V květnu 2010 byla Tasigna vysazena a nemocná byla připravována k nepřibuzenské transplantaci kostní dřeně. Pro onemocnění dárce došlo k odložení termínu přibližně o jeden měsíc a bylo zahájeno vyhledávání nového dárce. V mezidobí bez terapie došlo k akceleraci choroby s vyplavením blastů. Pro těžkou anémii byla u nemocné znovu zahájena léčba Tasignou v plném dávkování, došlo k regresi blastů a pacientka byla po přípravném režimu v červenci 2010 transplantována od HLA identického nepřibuzného dárce opačného pohlaví. Pro selhávání štěpu v den +34 po transplantaci byla ukončena imunosuprese a zahájena léčba imatinibem, která byla v září 2010 ukončena a zahájena terapie Tasignou. Po týdnu byla léčba pro cytopenii přerušena a kontrolním cytogenetickým vyšetřením prokázán další klonální vývoj karyotypu v Ph pozitivním klonu. Došlo ke ztrátě krátkých ramen derivovaného chromosomu 7 zahrnutého do translokace t(3;7) a duplikaci dlouhých ramen (která nesla část materiálu chromosomu 3) za vzniku isochromosomu i(7q): der(7)t(3;7)i(7q). Nemocná pokračovala v léčbě redukovanou dávkou Tasigny a růstovými faktory. V říjnu byl prokázán cytogenetickým vyšetřením další klonální vývoj karyotypu s nálezem nadpočetných chromosomů včetně přítomnosti dalšího Ph chromosomu. Blastický zvrát onemocnění byl potvrzen imunofenotypizačním vyšetřením. Pro cytogenetickou rezistenci na Tasignu nemocná léčbu ukončila a počátkem listopadu zahájila terapii Sprycelem (Dasatinib). Nemocná je v současné době připravována k 2. nepřibuzenské transplantaci.

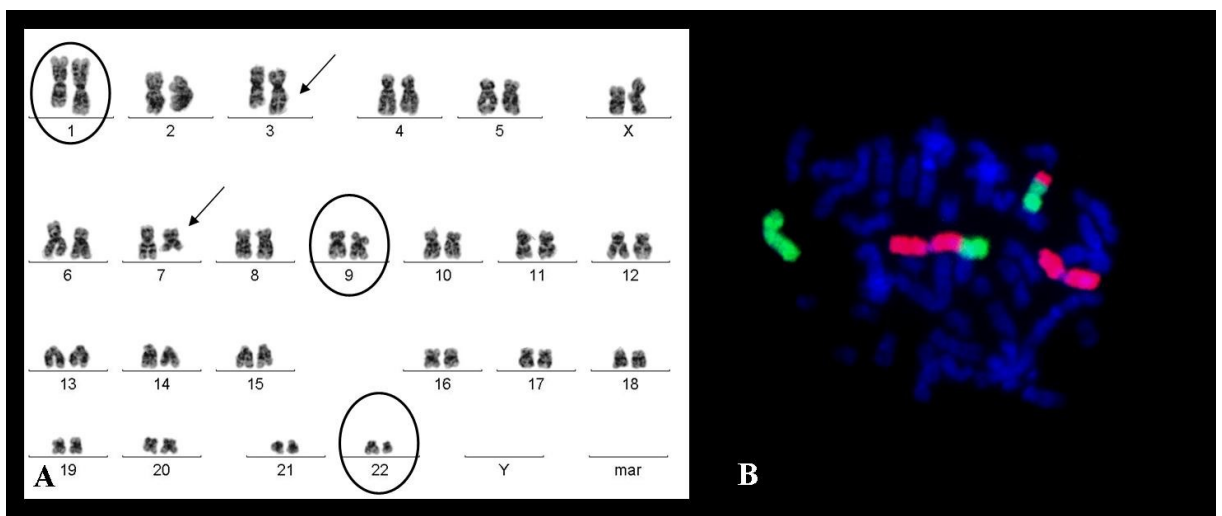
Několikastupňový klonální vývoj karyotypu u nemocné přehledně zobrazuje Tabulka 17 a Obrázky 17 – 20.

Tabulka 17: Přehled cytogenetických nálezů s klonálním vývojem karyotypu u nemocné č. 154

Datum	Výsledky cytogenetické analýzy
16.10.2008	46,XX,t(1;9;22)(q?42;q34;q11)[19]/ 46,XX,t(1;9;22)(q?42;q34;q11),i(17q)[1]
27.5.2009	46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11)[17]
30.9.2009	46,XX[2] 46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11)[2] 46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11),t(3;7)(q?26;q?22)[26]
16.12.2009	46,XX[7] 46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11)[4] 46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11),t(3;7)(q?26;q?22)[4]
4.2.2010	46,XX[9] 46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11),t(3;7)(q?26;q?22)[3]
25.8.2010	46,XX, t(1;9;22)(q42;q34;q11),der(7)t(3;7)(?q;q?22)i(7)(q10)[11]
15.9.2010	46,XX, t(1;9;22)(q42;q34;q11),der(7)t(3;7)(?q;q?22)i(7)(q10)[12]
27.10.2010	46,XX, t(1;9;22)(q42;q34;q11),der(7)t(3;7)(?q;q?22)i(7)(q10)[24] 52,XX,+X,t(1;9;22)(q42;q34;q11),der(7)t(3;7)(?q;q?22)i(7)(q10),+8,+9,+19,+20,+der(22)[14]



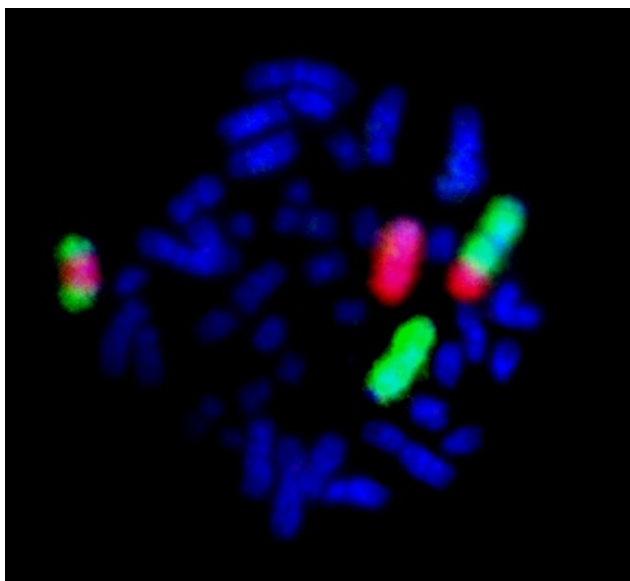
Obrázek 17: Karyotyp nemocné č. 154 v době stanovení diagnózy:
 46,XX,t(1;9;22)(q?42;q34;q11),i(17q)



Obrázek 18: Karyotyp (A) a FISH (B) u nemocné č. 154 s klonálním vývojem 11 měsíců od diagnózy onemocnění.

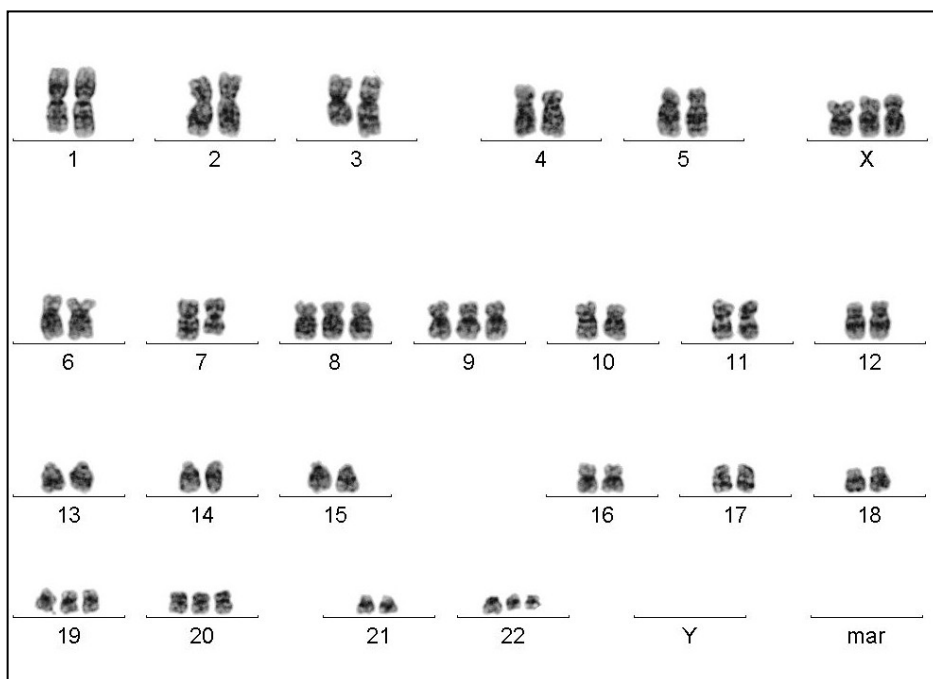
A – Karyotyp: 46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11),t(3;7)(q?26;q?22)

B – Vyšetření metodou FISH – potvrzující t(3;7): wcp 3 (TR) a wcp 7 (FITC) (MetaSystems)



Obrázek 19: Vyšetření metodou FISH, potvrzující další klonální vývoj 22 měsíců od diagnózy onemocnění: wcp 3 (FITC) a wcp 7 (TR) (MetaSystems):

$der(7)t(3;7)(?q;q?22)i(7)(q10)$



Obrázek 20: Karyotyp nemocné č. 154 z doby blastického zvratu:

$52,XX,+X,t(1;9;22)(q42;q34;q11),der(7)t(3;7)(?q;q?22)i(7)(q10),+8,+9,+19,+20,+der(22)$

6.3.2 Komplexní přestavby

V průběhu léčby onemocnění došlo k vývoji komplexních přestaveb karyotypu u 12 nemocných (30,8 %). U 6 z nich byl při diagnóze onemocnění prokázán v karyotypu pouze Ph chromosom, z toho u jednoho nemocného (č. 64) vznikl variantní translokací.

Tři nemocní měli v době diagnózy kromě Ph chromosomu ještě další přídatnou změnu (pac. č. 65, 154 a 213), u tří nemocných (č. 204, 256 a 263) cytogenetická data z doby stanovení diagnózy onemocnění neznáme.

Součástí komplexních přestaveb vyvinutých v průběhu onemocnění byla také trisomie chromosomu 8 (u 4 nemocných) a přídatný Ph chromosom (2 nemocní). Do komplexních přestaveb byly 4x zapojeny chromosomy 7, 8, 9 a 12, 2x chromosomy 13 a 22 a po jednom případě chromosomy X, Y, 1, 2, 3, 5, 11, 16, 17, 20 a 21.

Srovnání cytogenetických nálezů z doby diagnózy onemocnění s klonálním vývojem karyotypu ukazuje Tabulka 18.

Tabulka 18. Nemocní s komplexními přestavbami zjištěnými v průběhu léčby onemocnění

Pac. č.	Pohl.	Věk při Dg.	Cytogenetická analýza v době diagnózy	Cytogenetická analýza v průběhu léčby	Léčba	Léčebná odpověď	Celkové přežití
21	M	49	46,XY[5]/ 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[10]	46,XY[17]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[5]/ 46,XY,der(8)t(1;12;8)(p?32;p?13;q24)del(12)(p13),t(9;22)(q34;q11)[5]	IM 2.linie	MMR	97
64	M	64	46,XY,t(6;9;22)(q?21;q34;q11)[17]	45,XY,dic(7;12)(p11;p11),t(6;9;22)(q?21;q34;q11),i(9)(q11) [11]	IM 2.linie	MinimCyR	EX 35
65	M	25	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[7]/ 47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[7]	46,XY[1]/47,XY,t(9;22)(q34;q11), der(20)t(2;20)(?;p?12),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[cp9]	IM 1.linie	CMR	76
76	M	53	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	49,XY,+8,+12,+21,t(9;22)(q34;q11)[20]	Jiná léčba	NoCyR	EX 30
132	M	57	46,XY,t(9;22)(q34;q11) [30]	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6] 48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[2]	IM 1.linie	MinimCyR	EX 38
140	Ž	54	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[25]	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[26]/ 46,XX,der(9)t(9;22)(q34;q11)del(9)(q14)t(9;13)(p?12;q?13)[4]	IM 2.linie	MinimCyR	EX 108
154	Ž	50	46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11), idic(17)(q11) [19]	46,XX[2]/46,XY,t(1;9;22)(q42;q34;q11)[2]/ 46,XX,t(1;9;22)(q42;q34;q11),t(3;7)(q?26;q?22)[26]	IM 1.linie	PCyR	24
31	Ž	33	ND	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[19]/ 46,XX,der(1)t(1;?),der(2)t(2;?),t(9;22)(q34;q11)[3]	Jiná léčba	NoCyR	EX 65
213	M	57	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) [13]	FISH : +der(16)inv(16), 11q-, 13q-	IM 1.linie	CMR	14
246	Ž	69	46,XX,t(9;22)(q34;q11) [21]	46,XX,t(9;22)(q34;q11),der(17)t(?;17)(?;p?11)[3]/ 45,XX,-5,t(9;22)(q34;q11),der(17)t(5;17)(?;p?11)[3] /FISH: 60 % 17p-	IM 2.linie	NoCyR	EX 97
256	Ž	39	Nevíme	44,XX,t(9;22)(q34;q11),der(7)?del(7p),-12,-17,-18,+mar[6]/ 45,XX,t(9;22)(q34;q11),-17,-18,+mar[6]	IM 1.linie	NoCyR	EX 139
263	M	20	Nevíme	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[24]/46,XY,der(7),t(9;22)(q34;q11),der(12)[4]/ 47,XY,der(7),-8,t(9;22)(q34;q11),der(12),-13,+3mar[2]	IM 2.linie	NoCyR	EX 51

6.3.3 Delece 9q

Z celkem 14 nemocných s delecí 9q, došlo u dvou nemocných v průběhu onemocnění k vývoji **přídavných změn** (Tabulka 15). V jednom případě (nem. č. 67) se jednalo o isochromosom dlouhých ramen chromosomu 17, u druhého nemocného (č. 215) došlo k zachytu přídavné chromosomové změny – delece 13q14 v souvislosti s vývojem druhé hematologické malignity – chronické lymfatické leukémie (CLL).

6.3.4 Ztráta chromosomu Y

Ztráta chromosomu Y během léčby onemocnění byla prokázána u 4 (10 %) nemocných s přídavnými změnami (Tabulka 15), u nichž došlo ke ztrátě chromosomu Y v souvislosti s klonálním vývojem karyotypu v Ph negativním klonu. U všech 4 nemocných byla ztráta chromosomu Y zachycena cytogenetickým vyšetřením v malém počtu mitóz (1-3 z přibližně 20 hodnocených) jako jediná změna a byla potvrzena metodou FISH s centromerickou sondou CEP X/Y (Abbott Molecular) v 7 – 9 % hodnocených interfázových jádrech a vždy byla ztráta chromosomu Y prokázána i na mitózách.

6.3.5 Trisomie chromosomu 8

Trisomie chromosomu 8 v průběhu léčby byla prokázána u 11 (28 %) nemocných. U 6 nemocných (č. 41, 167, 204, 238, 241 a 260) v Ph pozitivním klonu, u 4 nemocných došlo k vývoji trisomie chromosomu 8 v Ph negativním klonu (pac. č. 94, 97, 162 a 189). U jedné nemocné (č. 129) nelze určit, v kterém klonu došlo k vývoji trisomie 8, nemocná prodělala extramedulární relaps v tříselné uzlině a vyšetření bylo provedeno na histologickém řezu z parafinového bločku uzliny (Tabulka 15).

6.3.6 Přídavné chromosomové změny v Ph negativním klonu

Z 39 pacientů s přídavnými chromosomovými změnami vyvinutými v průběhu léčby CML, se u 11 nemocných (28,2 %) chromosomové změny vyvinuly v Ph negativním klonu (Tabulka 15). U dvou nemocných to bylo v souvislosti s nástupem druhé hematologické

malignity (CLL) : u nemocného č. 147 byla prokázána trisomie 12 a u nemocného č. 215 delece 13q. U 4 nemocných byla prokázána v Ph- klonu +8 (č. 94, 97, 162 a 189) a u 4 nemocných ztráta chromosomu Y (pac. č. 126, 129, 200 a 206). U posledního nemocného byla cytogenetickým vyšetřením v karyotypu nemocného zjištěna přítomnost marker chromosomu, jehož původ se však nepodařilo pro nedostatečné množství buněčné suspenze prokázat.

6.4 Hodnocení léčebné odpovědi ve skupinách podle cytogenetických nálezů

6.4.1 Nemocní bez vstupních cytogenetických dat

V době diagnózy onemocnění 35 nemocných (13,7 %) nemělo vstupní cytogenetická data.

U 10 z nich (28,6 %) byly prokázány v průběhu léčby přídatné chromosomové změny.

IM v 1. linii byli léčeni 4 nemocní. Z nich jeden dosáhl CMR (pac. č. 212), dva MMR (pac. č. 9 a 170) a jeden NoCyR (pac. č. 79). Žijí 2 nemocní, dva zemřeli.

IM v 2.linii bylo léčeno 22 nemocných. 4 dosáhli CMR (pac. 32, 60, 69 a 130), dva MMR (36 a 161), 4 PCyR (č. 122, 129, 200 a 257), 4 MinorCyR (č. 33, 211, 233 a 264), dva MinimalCyR (č. 34 a 260) a 6 nemocných cytogenetické odpovědi nedosáhlo (č. 15, 167, 256, 261, 262 a 163). V současnosti žije 10 nemocných, 11 zemřelo a jeden (pac. č. 122) se ztratil ze sledování, poslední údaje jsou z roku 2003.

Jinou terapií bylo léčeno 8 nemocných a dosáhli CMR (1x), MMR (1x), PCyR (1x), MinorCyR (1x) a 4 nemocní nedosáhli žádné cytogenetické odpovědi.

Žijí pouze dva nemocní s dosaženou CMR (pac. č. 165) a MMR (pac. č. 204), 5 nemocných zemřelo a jeden nemocný (pac. č. 247) se ztratil ze sledování, kontroly účinnosti léčby nemocný absolvuje ve spádovém hematologickém centru.

Jeden nemocný podstoupil **TKB** a žije v kompletní molekulární remisi.

Z celkového počtu 35 nemocných s neznámou cytogenetickou v době diagnózy žije 14 nemocných, 19 nemocných zemřelo a dva se ztratili ze sledování (Tabulka 16).

6.4.2 Nemocní pouze s Ph chromosomem

Z celkového počtu všech 256 nemocných bylo 166 nemocných, kteří měli při diagnóze v karyotypu pouze Ph chromosom a nevyvinuli žádné změny v průběhu léčby.

43 nemocných (26 %) bylo léčeno IM v 1. linii léčby, 64 nemocných (38,5 %) IM v 2. linii léčby, 40 nemocných (24 %) bylo léčeno jinou terapií a 19 nemocných (11,4 %) podstoupilo TKB. Léčebnou odpověď uvádí Tabulka 19.

Tabulka 19: Léčebná odpověď u nemocných bez přídatných změn prokázaných v době diagnózy a v průběhu léčby onemocnění

	IM v 1. linii	IM v 2. linii	Jiná léčba	TKB	Celkem
CMR	7	17	5	10	39
MMR	26	21	1	1	49
CCyR	3	10	2	2	17
PCyR	5	8	3	0	16
MinorCyR	2	5	1	0	8
MinimalCyR	0	1	6	0	7
NoCyR	0	2	22	6	30
celkem	43	64	40	19	166
žijící	38	55	6	14	113
zemřelí	5	9	34	5	53

Žije 113 nemocných, 53 zemřelo.

6.4.3 Variantní translokace

Ve skupině 14 nemocných s variantní translokací byly 4 nemocní s přídatnými změnami. Z toho dva měli komplexní přestavby (pac. č. 35 a 113) a jejich odpověď na léčbu je popsána ve kapitole 6.4.4. U jednoho nemocného (pac. č. 187) byla prokázána delece 9q a je popsán v kapitole 6.4.5. U jedné nemocné s přídatnou změnou (č. 154) došlo ke

klonálnímu vývoji karyotypu, léčebná odpověď této nemocné je hodnocena v kapitole 6.4.4 a podrobně popsána jako kazuistika v kapitole 6.3.1.

Ze zbývajících 10 nemocných s variantní translokací se u dvou nemocných (č. 64 a 189) vyvinuly přídatné změny v průběhu léčby. Nemocný č. 64 je popsán v kapitole 6.4.5. a nemocný č. 189 v kapitole 6.4.7. hodnotící léčebnou odpověď u nemocných s trisomií chromosomu 8 v průběhu léčby. 8 nemocných (57 %) nevyvinulo žádné změny.

IM v 1. linii léčby byli léčeni 3 nemocní, všichni žijí. Jeden (pac. č. 42) v CMR 59 měsíců od diagnózy, dva (č. 54 a 218) v MMR 15 a 64 měsíců od diagnózy.

IM v 2. linii léčby byli léčeni 4 nemocní. Jeden nemocný (pac. č. 230) žije v CMR 76 měsíců od diagnózy, 2 nemocní (č. 68, 176) v MMR 103 a 129 měsíců od diagnózy. Jedna nemocná (č.177) dosáhla na IM jen PCyR a byla převedena na dasatinib, na němž dosáhla MMR, ve které žije 46 měsíců od diagnózy.

Jeden nemocný (č. 82) byl léčený **jiným typem léčby**. Dosáhl pouze minimální cytogenetické odpovědi 10 měsíců po zahájení terapie, po dalších 4 měsících přešel do blastického zvratu a 2 roky od diagnózy zemřel pro progresi onemocnění.

Z 8 nemocných, u kterých vznikl Ph chromosom variantní translokací a nedošlo ke klonálnímu vývoji, zemřel pouze 1 nemocný na progresi onemocnění, zbývajících 7 žije, dva v CMR a 5 v MMR.

6.4.4 Komplexní přestavby

6.4.4.1 Komplexní přestavby zjištěné v době diagnózy CML

Komplexní změny byly nalezeny v době diagnózy u 6 nemocných.

IM v první linii léčby byl léčený jen jeden nemocný (pac. č. 113), léčebná odpověď není hodnocena, pacient zemřel 4 měsíce po stanovení diagnózy z důvodů nesouvisejících s onemocněním.

IM ve druhé linii byli léčeni dvě pacientky (pac. č.35 a 87). U jedné z nich (pac. č. 35) byla léčba IM zahájena pro blastický zvrát, po 5 měsících bez odpovědi na léčbu podstoupila alogenní TKB a po 4 měsících zemřela na projevy GvHD. Průběh léčby u druhé z nich (pac. č. 87) byl komplikovaný jiným souběžně probíhajícím myeloproliferativním onemocněním s nálezem chromosomové přestavby v Ph negativním klonu. Nemocná zemřela 71 měsíců od stanovení diagnózy CML v souvislosti s jinou myeloproliferativní chorobou.

TKB podstoupili dva nemocní. Jedna nemocná (pac. č. 1) byla diagnostikována v akcelerované fázi s přechodem do blastického zvratu a po přípravném režimu byla transplantována. Dosáhla CCyR, ale po 27 měsících od stanovení diagnózy exitovala na projevy GvHD. Druhý nemocný (pac. č. 89) po TKB žije 120 měsíců od stanovení diagnózy v CMR.

Jiným typem terapie byla léčena pouze jedna nemocná (pac. č.19). U nemocné bylo onemocnění diagnostikováno v akcelerované fázi. Na léčbě IFN- α dosáhla jen MinimalCyR, po 10 měsících došlo k blastickému zvratu a nemocná po 23 měsících od stanovení onemocnění exitovala na progresi onemocnění

Pouze jeden nemocný s komplexními přestavbami detekovanými při stanovení diagnózy onemocnění žije (pac. 89), 5 nemocných zemřelo – 15, 25, 27, 71 a 4 měsíce od stanovení diagnózy. (Tabulka 13).

6.4.4.2 Komplexní přestavby zjištěné v průběhu léčby CML

Komplexní přestavby nově vyvinuté v průběhu léčby byly prokázány u 12 nemocných.

IM v 1. linii léčby byli léčeni 2 nemocní. Jeden nemocný (č. 213) přešel na léčbě IM do akcelerované fáze, ve stejném čase u něj došlo k vývoji jiné hematologické malignity (CLL), byl transplantován a žije 15 měsíců od diagnózy v CMR. Tento případ je popsán v samostatné části zabývající se druhou malignitou při léčbě CML. Druhá pacientka (č.154) léčená IM v první linii nereagovala na léčbu, byla neúspěšně transplantována, poté léčena inhibitory tyrosinkináz 2. generace bez odpovídajícího efektu. V současné době žije v PCyR 24 měsíců od diagnózy. Kazuistika je popsána v kapitole vývoje přídatných změn u nemocných s variantní translokací.

Imatinibem v 2. linii léčby bylo léčeno 8 nemocných. Jeden (pac. č. 21) dosáhl CCyR po 3 měsících léčby IM a žije v MMR 97 měsíců od stanovení diagnózy onemocnění. Další nemocný (č. 65) na léčbu IM nezareagoval a byl 9 měsíců po stanovení diagnózy transplantován, žije v CMR.

Zbývajících 6 nemocných zemřelo. U jednoho nemocného (č. 64) došlo po dosažení CCyR k progresi onemocnění a zemřel 35 měsíců od diagnózy onemocnění. Dva nemocní (pac. č. 132 a 140) dosáhli MinimalCyR a zemřeli 38 a 108 měsíců od diagnózy. Tři nemocní (pac. č. 246, 256 a 263) nedosáhli na léčbě žádné odpovědi a zemřeli 97, 139 a 52 měsíců od stanovení diagnózy.

Jinou terapií byli léčeni dva nemocní (pac. č. 31 a 76), nedosáhli na léčbě žádné odpovědi a zemřeli 30 a 65 měsíců od diagnózy v souvislosti s progresí onemocnění.

Z celkem 12 nemocných s komplexním karyotypem prokázaným v průběhu léčby žijí 4 nemocní, dva na léčbě IM v 1. linii, 2 IM ve 2. linii (Tabulka 18).

6.4.5 Delece 9q

IM v 1. linii léčby byli léčeni 2 nemocní, dosáhli kompletní cytogenetické odpovědi na IM 3 (pac. č. 9) a 20 (pac. č. 187) měsíců od zahájení terapie a žijí v MMR (pac. č. 9) a CCyR (pac. č. 187) 64 a 21 měsíců od diagnózy.

Na **IM v 2. linii** léčby bylo převedeno 11 nemocných (4 pro akceleraci onemocnění, 7 pro selhání léčby IFN- α). Dva z nich podstoupili TKB - pac. č. 67 pro selhání léčby IM (v současnosti žije v CMR). Druhý z nich (pac. č. 219) dosáhl na IM pouze velké cytogenetické odpovědi po 6 měsících od zahájení terapie, podstoupil alogenní příbuzenskou TKB žije v kompletní molekulární remisi. 9 nemocných dosáhlo na IM CCyR, 5 z nich žije v CMR, 4 v MMR

Jiným typem terapie byla léčena pouze jedna nemocná (pac. č.156). Krátce po zahájení léčby IFN- α přešla do blastického zvratu a byla léčena terapií pro akutní lymfoblastické leukemie. Zemřela 5 měsíců od stanovení diagnózy.

Z celkového počtu 14 nemocných s delecí 9q dva nemocní zemřeli (pac. č. 156 a 215) 5 a 121 měsíců od diagnózy onemocnění, jeden v blastické zvratu, druhý pro progresi onemocnění. Celkem 12 nemocných žije, 6 v CMR, 6 dosáhlo PCyR.

6.4.6 Ztráta chromosomu Y

6.4.6.1 Ztráta chromosomu Y v době diagnózy CML

V době diagnózy CML byla ztráta Y chromosomu prokázána u 5 nemocných.

Dva nemocní byli léčeni **IM v 1.linii léčby** – jeden (pac. č. 213) vyvinul během léčby druhou hematologickou malignitu a je popsán samostatně v kapitole zabývající se další hematologickou malignitou při CML, druhý (pac.č. 249) dosáhl PCyR a žije 24 měsíců od diagnózy onemocnění.

Dva nemocní byli léčeni **IM v 2. linii léčby**. Jeden (pac. č. 71) zahájil léčbu pro progresi onemocnění 22 měsíců po transplantaci kostní dřeně, dosáhl CMR a žije 108 měsíců od počátku diagnózy. Druhý (pac.č.112) dosáhl na IM PCyR po 8 měsících léčby, pro progresi onemocnění byl po 28 měsících převeden na léčbu dasatinibem s dosažením PCyR po 6 měsících léčby. Po 34 měsících léčby dasatinibem zahájil léčbu nilotinibem. Nemocný žije ve PCyR 80 měsíců od diagnózy onemocnění.

Poslední nemocný (pac. č. 89) žije po **TKB**, byl popsán v části komplexní přestavby.

6.4.6.2 Ztráta chromosomu Y v průběhu léčby

Ztráta chromosomu Y se vyvinula na léčbě u 4 nemocných. Tři byli léčeni **IM v 1.linii léčby**. Všichni tři dosáhli na IM CCyR a žijí v CCyR 40 měsíců od diagnózy (pac. č. 128), CMR 63 měsíců od diagnózy (pac. č. 131) a MMR 48 měsíců od stanovení diagnózy (pac. č. 206). Jeden nemocný (pac. č. 200) byl léčen **IM v 2. léčebné linii**. Nemocný žije v CCyR 118 měsíců od diagnózy onemocnění.

6.4.7 Trisomie chromosomu 8

6.4.7.1 Trisomie chromosomu 8 v době diagnózy CML

Trisomie chromosomu 8 byla v době stanovení diagnózy prokázána u 3 nemocných, z toho jednou jako součást komplexních přestaveb u nemocného č. 113. Nemocný byl popsán v kapitole s komplexními přestavbami.

2 nemocní (č. 7 a 208) byli léčeni **IM ve 2.linii léčby** pro akceleraci na IFN- α . Oba žijí, pac č. 7 v MinorCyR 139 měsíců od stanovení diagnózy, pac. č. 208 v CCyR 154 měsíců od diagnózy.

6.4.7.2 Trisomie chromosomu 8 v průběhu léčby

V průběhu léčby byla trisomie chromosomu 8 prokázána u 11 nemocných.

IM v 1. linii léčby byl léčen jeden nemocný (pac. č. 97), žije v MMR 68 měsíců od diagnózy onemocnění.

IM v 2. linii bylo léčeno 8 nemocných. Dva nemocní (č. 189 a 241) žijí v CCyR 123 a 70 měsíců od diagnózy, 3 nemocní (pac. č. 41, 129 a 162) dosáhli PCyR a žijí 251, 91 a 106 měsíců od diagnózy, jedna pacientka (č. 260) dosáhla MinimalCyR a zemřela 289 měsíců od diagnózy onemocnění. U nemocného č. 167 došlo k selhání léčby a pacient zemřel 93 měsíců od diagnózy. Nemocná č. 94 žije ve MMR 97 měsíců od diagnózy onemocnění, došlo u ní k rozvoji další hematologické malignity a je popsána v příslušné kapitole jako kasuistika.

Jedna nemocná (č. 204) byla léčena **jinou terapií**. Dosáhla MMR a žije 99 měsíců od stanovení diagnózy.

Jeden nemocný (č. 238) podstoupil pro opětovné selhání léčby opakovaně alogenní **TKB**, žije v CMR 154 měsíců od stanovení diagnózy.

Celkem žije 9 nemocných, 2 nemocní exitovali v souvislosti s progresí choroby.

6.4.8 Nemocní s jinými chromosomovými změnami

Ze 44 nemocných s přidavnými změnami prokázanými v době diagnózy onemocnění bylo 12 nemocných s jinými ojediněle se opakujícími změnami (Tabulka 15).

IM v 1. linii léčby byli léčeni 3 nemocní (č. 11, 206 a 226). Všichni 3 dosáhli na IM CCyR 5, 10 a 12 měsíců od zahájení diagnózy a všichni 3 žijí v MMR 15, 48 a 55 měsíců od stanovení diagnózy.

IM ve 2. linii léčby bylo léčeno 6 nemocných. (č. 25, 45, 93, 109, 209 a 258). Pouze 3 z nich dosáhli na IM CCyR (č. 25, 109 a 209) – 15, 3 a 9 měsíců od zahájení léčby a žijí v CMR (č. 209), CCyR (č. 109) a PCyR (č. 25). Z dalších tří nemocných dosáhl jeden (č. 258) minimální cytogenetické odpovědi na IM, dva (č. 45 a 93) na léčbu IM neodpověděli a všichni tři zemřeli 10, 20 a 60 měsíců od diagnózy onemocnění.

Jiným typem léčby byli léčeni 3 nemocní (č. 44, 53 a 143). Jeden (č. 44) dosáhl velké cytogenetické odpovědi na IFN- α , zbylí dva na léčbu neodpověděli a všichni tři zemřeli 33, 68 a 30 měsíců od stanovení onemocnění.

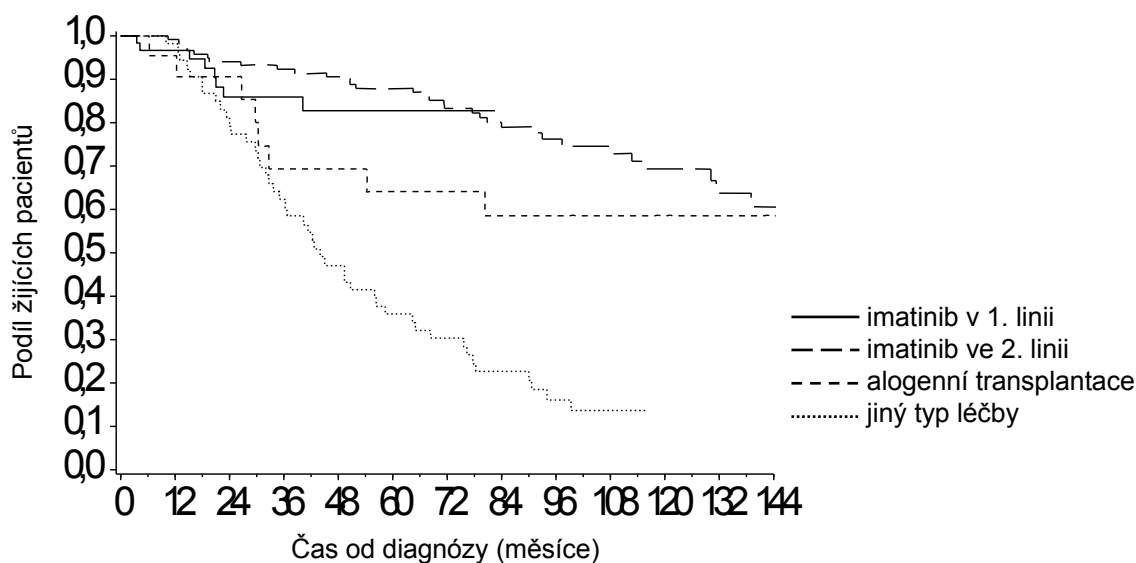
6.5 Hodnocení léčebné odpovědi ve skupinách podle typu léčby

256 nemocných v souboru bylo rozděleno do skupin podle typu použité léčby, kterou uvádí Tabulka 20. Graf 3 uvádí celkové přežití nemocných podle typu léčby, Graf 4 uvádí přežití pacientů od zahájení léčby imatinibem podle linie léčby: A) celkem, B) v chronické fázi CML.

Léčba	N	%
imatinib v 1. linii	60	23,4 %
imatinib ve 2. linii	119	46,5 %
alogenní transplantace	21	8,2 %
jiná léčba	56	21,9 %

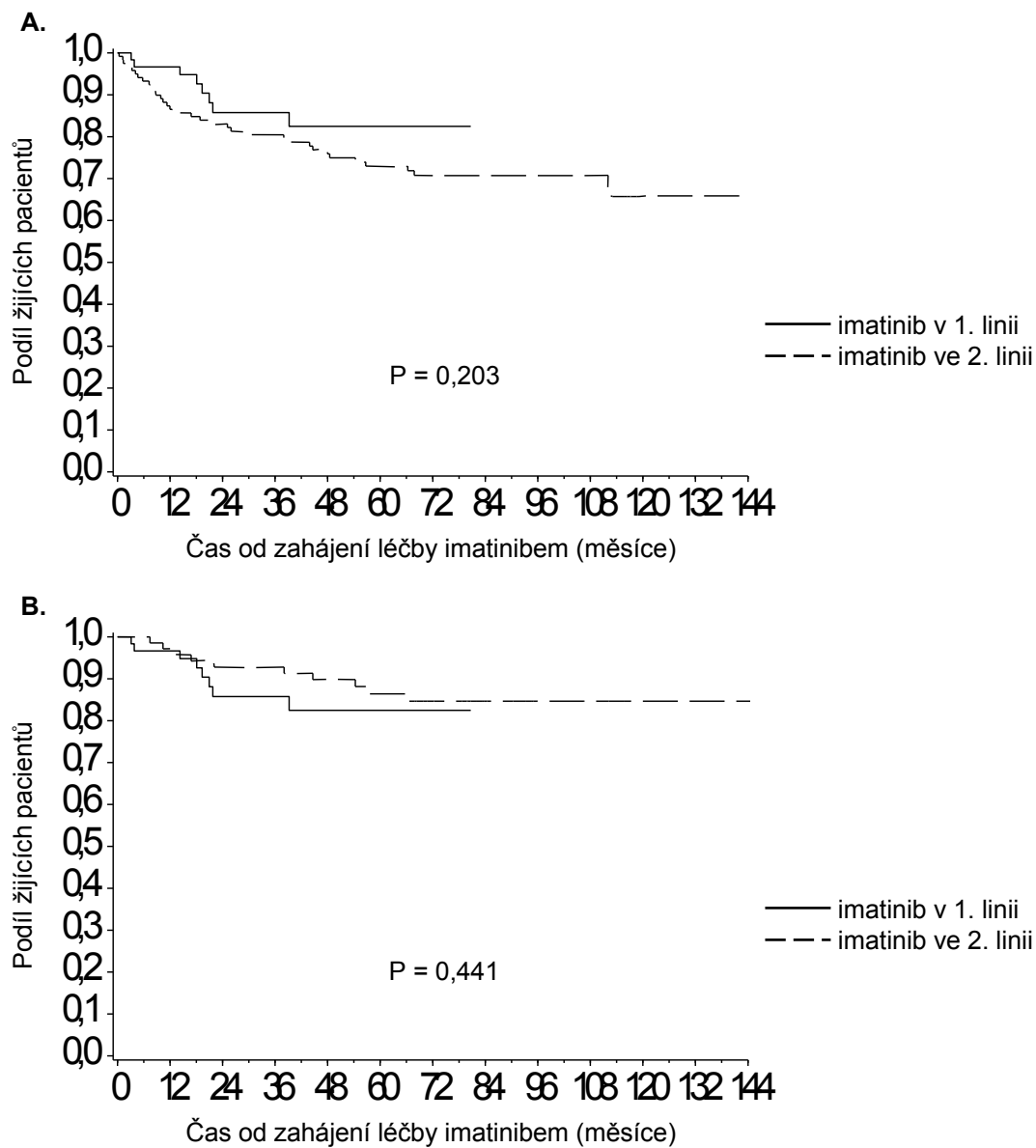
Tabulka 20: Rozdělení nemocných do skupin podle léčby CML

Graf 3: Celkové přežití souboru pacientů podle typu léčby



Křivka přežívání nemocných léčených IM v 1. linii nezohledňuje pacienty, kteří zemřeli z jiných příčin než v souvislosti s CML (Viz kapitola Diskuse).

Graf 4: Přežití pacientů od zahájení léčby imatinibem podle linie léčby: A) celkem, B) v chronické fázi CML



Křivka přežívání nemocných léčených IM v 1. linii nezohledňuje pacienty, kteří zemřeli z jiných příčin než v souvislosti s CML (Viz kapitola Diskuse).

6.5.1 Imatinib v 1. linii léčby

IM v 1. linii léčby bylo léčeno 60 nemocných v chronické fázi onemocnění, kteří byli diagnostikováni po roce 2003. Charakteristiku souboru uvádí Tabulka 21, 22 a 23.

Tabulka 21: Základní charakteristika souboru pacientů léčených IM v 1. linii (N = 60)

Pohlaví	N (%)
muži	40 (66,7 %)
ženy	20 (33,3 %)
Věk při diagnóze CML	
	N = 60
průměr	52 let
medián	53 let
minimum - maximum	20 - 77 let
Fáze CML při zahájení léčby imatinibem	
	N (%)
chronická	60 (100%)
akcelerace	0
blastický zvrát	0
Přidatné chromosomové změny při dg. CML	
	N (%)
přítomny	11 (18,3 %)
nepřítomny	49 (81,7 %)
Variantní translokace	
	N (%)
přítomna	6 (10,0 %)
nepřítomna	54 (90,0 %)

Tabulka 22: Stav pacientů léčených IM v 1. linii a sledování v čase (N = 60)

	Žijící	Zemřelí	Všichni
Délka sledování (měsíce)	N = 52 (86,7 %)	N = 8 (13,3 %)	N = 60 (100,0 %)
průměr	40,0	18,3	37,1
medián	39,3	19,6	33,3
minimum - maximum	8,7 - 82,5	3,5 - 40,2	3,5 - 82,5

Tabulka 23: Stav pacientů léčených IM v 1. linii při posledním sledování

Celkem	
N = 60	
CMR	10 (16,7 %)
MMR	30 (50,0 %)
CCyR	5 (8,3 %)
PCyR	5 (8,3 %)
MinorCyR	1 (1,7 %)
MinimCyR	1 (1,7 %)
NoCyR	
úmrtí	8 (13,3 %)

Z celkem 60 nemocných dosáhlo cytogenetickou odpověď 52 nemocných, 8 zemřelo, z toho pouze 2 na progresi onemocnění.

6.5.2 Imatinib v 2. linii léčby

IM v 2. linii léčby bylo léčeno 119 nemocných. V převážné části se jednalo o nemocné, kteří byli léčeni IFN- α , na kterém dosáhli pouze částečné, případně žádné odpovědi a došlo u nich k akceleraci choroby nebo k blastickému zvratu. Pro selhání léčby IFN- α byli převedeni na léčbu IM. Charakteristiku souboru uvádí Tabulka 24, 25 a 26.

Tabulka 24: Základní charakteristika souboru pacientů léčených IM ve 2. linii (N = 119)

Pohlaví	<i>N (%)</i>
muži	74 (62,2 %)
ženy	45 (37,8 %)
Věk při diagnóze CML	<i>N = 119</i>
průměr	47 let
medián	50 let
minimum - maximum	17 - 78 let
Věk při zahájení léčby imatinibem	<i>N = 119</i>
průměr	50 let
medián	53 let
minimum - maximum	18 - 79 let
Fáze CML při zahájení léčby imatinibem	<i>N (%)</i>
chronická	70 (58,8 %)
akcelerace	43 (36,1 %)
blastický zvrát	6 (5,0 %)
Přidatné chromosomové změny při dg. CML	<i>N (%)</i>
přítomny	26 (21,8 %)
nepřítomny	81 (68,1 %)
neznámo	12 (10,1 %)
Variantní translokace při dg. CML	<i>N (%)</i>
přítomna	7 (5,9 %)
nepřítomna	112 (94,1 %)

Tabulka 25: Stav pacientů léčených IM ve 2. linii a sledování v čase (N = 119)

	Žijící	Zemřelí	Všichni
Délka sledování od diagnózy CML (měsíce)	N = 85 (71,4 %)	N = 34 (28,6 %)	N = 119 (100 %)
průměr	106,2	74,2	97,0
medián	97,1	69,7	90,8
minimum - maximum	12,0 - 251,1	10,4 - 289,4	10,4 - 289,4
Délka sledování od zahájení léčby imatinibem (měsíce)	N = 85 (71,4 %)	N = 34 (28,6 %)	N = 119 (100 %)
průměr	81,7	25,5	65,7
medián	82,3	14,7	70,6
minimum - maximum	10,0 - 203,4	0,4 - 112,1	0,4 - 203,4

Tabulka 26: Stav pacientů léčených IM ve 2. linii při posledním sledování

	Chronická fáze při zahájení léčby imatinibem	Akcelerace / blastický zvrát při zahájení léčby imatinibem	Celkem
	N = 70	N = 49	N = 119
CMR	15 (21,4 %)	11 (22,4 %)	26 (21,8 %)
MMR	22 (31,4 %)	4 (8,2 %)	26 (21,8 %)
CCyR	11 (15,7 %)	4 (8,2 %)	15 (12,6 %)
PCyR	8 (11,4 %)	4 (8,2 %)	12 (10,1 %)
MinorCyR	2 (2,9 %)	2 (4,1 %)	4 (3,4 %)
MinimCyR			
NoCyR	2 (2,9 %)		2 (1,7 %)
úmrtí	10 (14,3 %)	24 (49,0 %)	34 (28,6 %)

Cytogenetickou odpověď dosáhlo 83 nemocných, z toho CCyR 67 nemocných, zemřelo 34 (28,6 %) nemocných.

6.5.3 Transplantace krvetvorných buněk (TKB)

Z celkového počtu 256 nemocných v našem souboru podstoupilo alogenní transplantaci krvetvorných buněk 21 nemocných. Charakteristiku souboru uvádí Tabulka 27, 28 a 29.

Tabulka 27: Základní charakteristika souboru pacientů s alogenní transplantací (N = 21)

Pohlaví	N (%)
muži	10 (47,6 %)
ženy	11 (52,4 %)
Věk při diagnóze CML	N = 21
průměr	36 let
medián	36 let
minimum - maximum	16 - 54 let
Přídavné chromosomové změny při dg. CML	N (%)
přítomny	2 (9,5 %)
nepřítomny	18 (85,7 %)
neznámo	1 (4,8 %)
Variantská translokace	N (%)
přítomna	0 (0,0 %)
nepřítomna	21 (100 %)

Tabulka 28: Stav pacientů s alogenní transplantací a sledování v čase (N = 21)

	Žijící	Zemřelí	Všichni
Délka sledování (měsíce)	N = 16 (76,2 %)	N = 5 (23,8 %)	N = 21 (100 %)
průměr	96,0	25,8	79,2
medián	109,8	26,6	88,2
minimum - maximum	0,0 - 216,3	6,2 - 54,2	0,0 - 216,3

Tabulka 29: Stav pacientů s alogenní transplantací při posledním sledování

	Celkem N = 21
CMR	12 (57,1 %)
MMR	1 (4,8 %)
CCyR	1 (4,8 %)
PCyR	
MinorCyR	
MinimCyR	
NoCyR	2 (9,5 %)
úmrtí	5 (23,8 %)

Z celkem 21 nemocných, kteří byli léčeni TKB, žije v kompletní cytogenetické odpovědi 14 nemocných, 5 nemocných zemřelo na komplikace TKB.

6.5.4 Jiný typ léčby

Nemocní s jiným typem léčby byli léčeni převážně IFN- α , které zpravidla předcházela cytoredukce hydroxyureou (Litalir). Část nemocných byla léčena kombinací léčby IFN- α /ARA-C. Charakteristiku souboru uvádí Tabulka 30, 31 a 32.

Tabulka 30: Základní charakteristika souboru pacientů s jiným typem léčby (N = 56)

Pohlaví	N (%)
muži	28 (50 %)
ženy	28 (50 %)
Věk při diagnóze CML	N = 56
průměr	54 let
medián	56 let
minimum - maximum	19 - 83 let
Přídavné chromosomové změny při dg. CML	N (%)
přítomny	5 (8,9 %)
nepřítomny	45 (80,4 %)
neznámo	6 (10,7 %)
Variantní translokace	N (%)
přítomna	1 (1,8 %)
nepřítomna	55 (98,2 %)

Tabulka 31: Stav pacientů s jiným typem léčby a sledování v čase (N = 56)

	Žijící	Zemřelí	Všichni
Délka sledování (měsíce)	N = 8 (14,3 %)	N = 48 (85,7 %)	N = 56 (100 %)
průměr	142,1	44,6	58,5
medián	138,9	38,5	43,3
minimum - maximum	84,4 - 219,0	10,0 - 99,4	10,0 - 219,0

Tabulka 32: Stav pacientů s jiným typem léčby při posledním sledování

	Celkem
	N = 56
CMR	5 (8,9 %)
MMR	1 (1,8 %)
CCyR	
PCyR	
MinorCyR	
MinimCyR	
NoCyR	2 (3,6 %)
úmrtí	48 (85,7 %)

Z celkem 56 nemocných léčených jiným typem terapie žije pouze 8 (14,3 %) nemocných s mediánem sledování 138,9 měsíců. CCyR dosáhlo pouze 6 (10,7 %) nemocných.

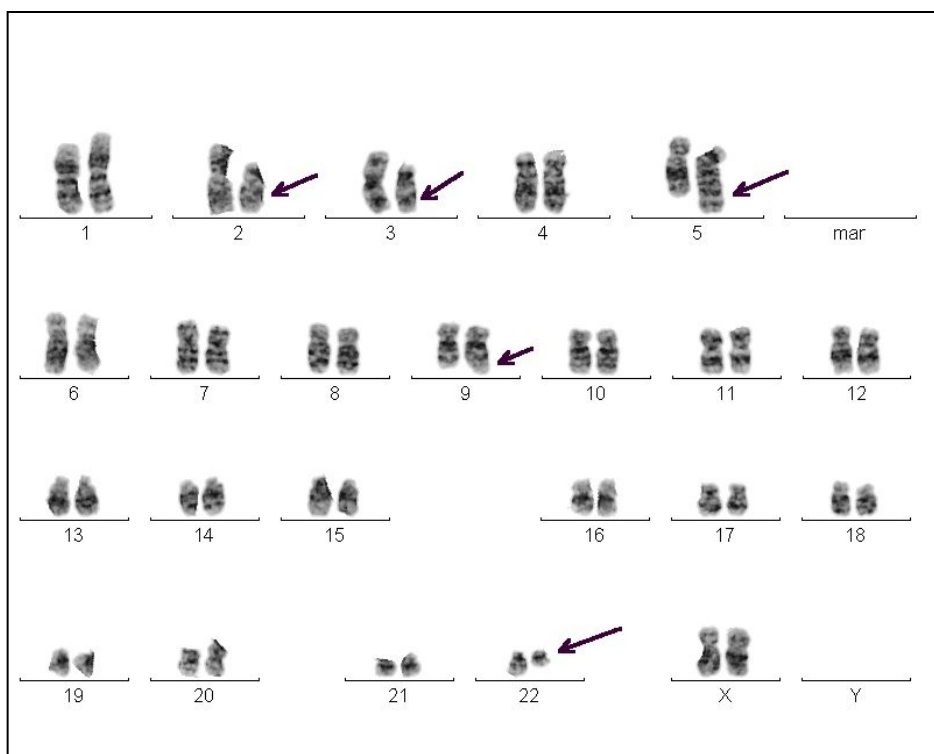
6.6 Nemocní s druhou hematologickou malignitou (kazuistiky)

U 5 nemocných došlo k vývinu 2. hematologické malignity. U jednoho nemocného (č. 147) se vyvinula CML jako 2. malignita 9 měsíců po diagnóze CLL, dva nemocní (č. 213 a 215) onemocněli 6 a 55 měsíců od diagnózy CML chronickou lymfatickou leukémií, jedna nemocná (č. 94) myelodysplastickým syndromem a u další nemocné (č. 87) došlo k vývinu CML při skrytém jiném myeloproliferativním onemocnění. Všichni nemocní jsou popsáni v následujících kazuistikách.

6.6.1 Kazuistika 1. – pacientka č. 87

Při analýze souboru 256 nemocných s CML, jsme našli výskyt přídatné chromosomové změny u 44 nemocných. Jedna nemocná měla zajímavou komplexní translokaci, která byla cílem našich cytogenetických a molekulárně cytogenetických vyšetření.

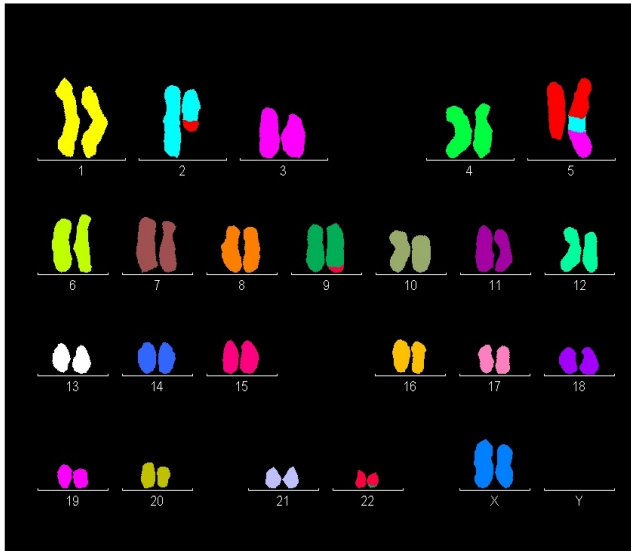
Jedná se o 56-letou pacientku, u které byla diagnostikována v březnu 2004 Ph pozitivní CML v chronické fázi. U pacientky byla již 3 roky pozorována anémie, trombocytóza a splenomegalie. V době diagnózy měla pacientka Sokalovo skóre 0,87 a EURO skóre 1453. Cytogenetické vyšetření v době diagnózy odhalilo přítomnost Ph chromosomu jako výsledek translokace $t(9;22)(q34;q11)$ s přídatnou chromosomovou změnou zahrnující derivované chromosomy 2, 3 a 5 ve všech 14 analyzovaných metafázích (Obrázek 21).



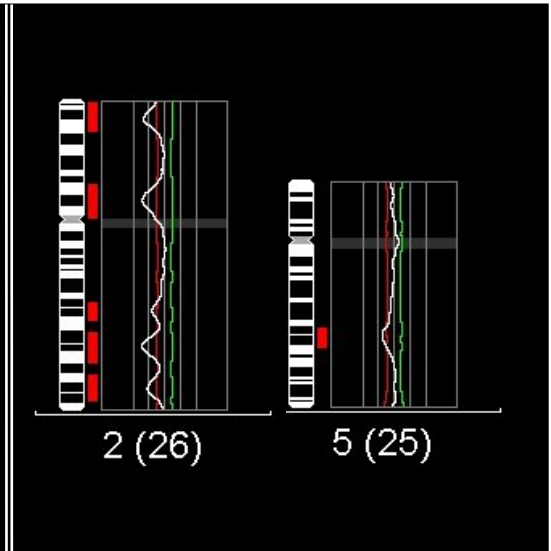
Obrázek 21: Karyotyp nemocné č. 87: 46,XX,der(2),der(3),der(5),t(9;22)(q34;q11)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se sondou LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe (Abbott Molecular) prokázala přítomnost fúzního genu *BCR/ABL1*.

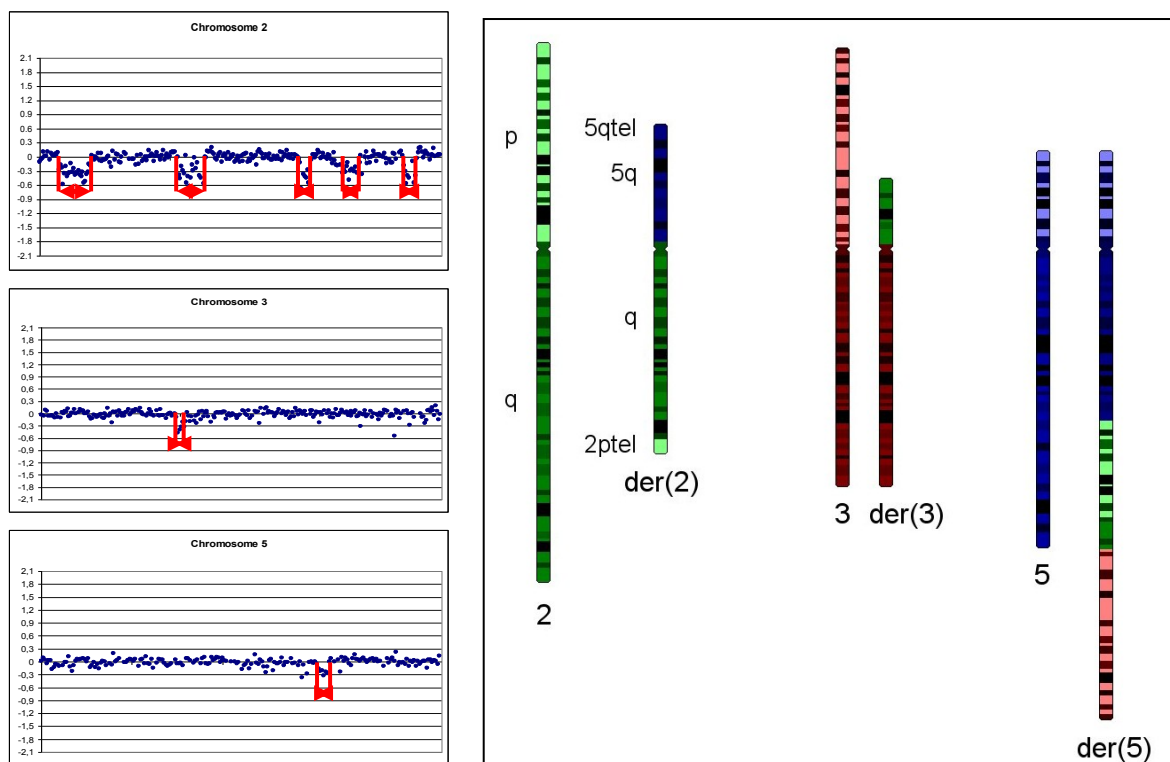
Pro přesnější určení přídatné změny byla použita metoda M-FISH, která prokázala komplexní translokaci s inzercí $t(2;3;5)(q?p;q?)ins(2;5)(?q?q?)$. K detailnějšímu určení této abnormality byla M-FISH (Obrázek 22) doplněna dalšími vyšetřeními metodou FISH s lokusově specifickými (Abbott Molecular) malovacími (Cambio), ramenově specifickými (MetaSystems) a BAC-derivovanými sondami (Prof. M. Rocchi, Itálie) a metodou CGH (Obrázek 23) a arrayCGH (Obrázek 24).



Obrázek 22: M-FISH



Obrázek 23: CGH profil chr. 2 a 5.



Obrázek 24: arrayCGH chr. 2, 3 a 5 Obrázek 25: Schematické znázornění t(2;3;5)

Schematické znázornění této nové přídavné komplexní aberace je na Obrázku 25. Ke kvantitativnímu stanovení interfázních a metafázních buněk s touto komplexní translokací byla použita sonda LSI N-myc probe (Abbott Molecular), která hybridizuje v oblasti 2p24.1. Byla potvrzena delece oblasti 2p24.1 již v době diagnózy v 92 % vyšetřených buněk. K určení zastoupení Ph pozitivního a Ph negativního klonu byla kombinována sonda LSI BCR/ABL ES s výše uvedenou LSI N-myc sondou. Delece byla detekována v době diagnózy v obou klonech, v klonu s Ph chromosomem i v malém klonu (22 %) Ph negativních buněk. Pacientka byla zpočátku léčena hydroxyureou (HU) a IFN- α , avšak z důvodu přítomnosti přídavných cytogenetických abnormalit a nedosažení kompletní hematologické odpovědi, po 2 měsících od diagnózy byla zahájena léčba imatinibem, 400 mg denně. Pacientka dosáhla kompletní cytogenetické odpovědi (2 z 382 analyzovaných interfázních buněk v kostní dřeni byly Ph pozitivní) a částečné hematologické odpovědi s perzistencí anémie (léčené s dočasným úspěchem deriváty železa a erythropoetinem) a trombocytémie. Po 9 měsících léčby IM se objevila hematologická progresse s bazofilií a posunem doleva, ačkoli počet *BCR/ABL1* pozitivních buněk v periferní krvi klesl ze 70 % před nasazením IM na 1 %. Dávka IM byla zvýšena na 600 mg denně. Po měsíci intenzivní

terapie nastala stabilizace blastické krize a *BCR/ABL1* fúze nebyla pomocí kvantitativní RT-PCR ani nested RT-PCR detekovatelná. Po roce zvýšeného dávkování IM došlo k hematologické progresi se zhoršující se anémií a trombocytémií a k posunu doleva k promyelocytům. Hematologický nálezn: WBC $5,9 \times 10^9/l$, RBC $3,26 \times 10^{12}/l$, Hb 88g/l, Htc 0,27, MCV 83,2fl, PLT $933 \times 10^9/l$. Manuální diferenciální počty: segmenty 0,55, tyče 0,09, metamyelocyty 0,03, myelocyty 0,01, blasty 0,02, eosinofily 0,01, basofily 0,02, monocyty 0,04, lymphocyty 0,23, erytroblasty 4/100. Laktát dehydrogenáza: 8,11 ukat/l (horní hranice 3,55), ostatní biochemické ukazatele byly v normálních mezích. Při fyzickém vyšetření během hlubokého vdechu byla hmatná slezina. *BCR/ABL1* klon nebyl detekovatelný pomocí PCR, ale procentuální zastoupení buněk s přídatnou aberací a karyotypem 46,XY,t(2;3;5)ins(2;5)[23] se nezměnilo. Z těchto důvodů byla dávka IM zvýšena na 800 mg denně, který byl při dvou příležitostech vyměněn za dasatinib, indikovaný na základě *in vitro* testů senzitivity buněk pacientky k inhibitorům tyrosinové kinázy. Ani v jednom případě však po dasatinibu nebyla pozorována pozitivní odpověď. Vzhledem k hematologické progresi na vysokých dávkách IM (při trvající molekulární odpovědi při vyšetření kvantitativní RT-PCR *BCR/ABL1*) byla nemocná převedena na paliativní léčbu hydroxyureou, jelikož nebyl nalezen vhodný nepříbuzenský dárcce k provedení transplantace krvetvorných buněk a pacientka netolerovala IFN- α při opakovaném pokusu o jeho znovunasazení. Na léčbě hydroxyureou bylo možné pozorovat přechodné zmenšení sleziny. Nicméně s postupem času došlo k postupnému zhoršování celkových potíží (horečky, profúzní pocení, hubnutí), k prohloubení anémie a postupnému nárůstu splenomegalie a nemocná exitovala necelých šest let po stanovení diagnózy. Bezprostřední příčinou úmrtí byl zánět plic. Kromě cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření bylo u pacientky provedeno vyšetření aktivace SFK kináz.

Src kinázy jsou aktivovány u mnoha typů nádorových onemocnění člověka. Jako rozhodující signální molekula může SFK podporovat aktivitu mnoha onkogenních signálních drah (Ishizawar, 2004). U myeloproliferativních onemocnění kromě Ph pozitivních CML jsou SFK aktivovány onkogenními fúzními variantami růstového faktoru destiček *PDGFR β* . Interakce mezi fúzní kinázou a Src kinázou je nezbytná pro vývoj myeloidního onemocnění (Tomasson, 2000). K vyšetření byla použita metoda Western blot s imunodetekcí s použitím fosfospecifických protilátek pro Src rodinu kináz. Po krátké *in vitro* inkubaci leukocytů s IM byla stále detekovatelná fosforylace SFK, dokazují jejich aktivaci za pomoci alternativní signální dráhy neblokované IM a nezávislé na *BCR/ABL1*.

Abychom prokázali nebo potvrdili zapojení genu *PDGFRβ* do komplexní translokace, provedli jsme FISH se sondou pro gen *PDGFRβ* (5q33) (Qbiogene, MP Biomedicals, CA) a gen *EGR1* (5q31) (Abbott Molecular). Ukázalo se, že signál pro gen *PDGFRβ* je lokalizován na krátkém raménku derivovaného chromosomu 2, ale nejedná se o přestavbu tohoto genu.

Náš nález ukazuje, že se komplexní změna objevila ještě před vznikem Ph chromosomu. Následný vznik Ph chromosomu u pacientky s pre-existujícím myeloproliferativním onemocněním je vzácný případ, obvykle spojený s předchozí chemoterapií. Naše pacientka nebyla před diagnosou CML léčena, což spíše odpovídá případu popsanému autory Curtin NJ et al. (Curtin, 2005). Jsou popsány ještě další dva podobné případy vývoje Ph chromosomu na základě pre-existujícího genetického markeru, *JAK2* V617F mutace (Kramer, 2007) a t(2;11) (Royer-Pokora, 2003). Po eradikaci *BCR-ABL1* fúzního genu léčbou IM, zůstal původní genetický marker ve vysokém procentu buněk u obou těchto případů. To odpovídá i případu naší pacientky, u které byla prokázána chromosomová změna v Ph negativním klonu i po vymizení Ph pozitivních buněk. Výše uvedená fakta naznačují, že u těchto případů je do patogeneze myeloproliferativního onemocnění zapojen jiný onkogen než *BCR/ABL1*, pravděpodobně asociovaný s nestabilitou DNA. U naší pacientky byly leukemické buňky po vymizení Ph pozitivního klonu charakterizovány aktivací Src kináz. Vzhledem k nedostatečné inhibici Src kináz *in vitro* pomocí IM byla tato pacientka vhodným kandidátem pro léčbu novou rodinou Src inhibitorů, jako je Dasatinib. Ani tato léčba nevedla u nemocné k dosažení klinické odpovědi a nemocná na paliativní léčbě umírá na selhání plic. Aktivace SFK byla nezávislá na Bcr-Abl kináze, ale byla spojená s novou přídatnou komplexní chromosomální přestavbou přítomnou v leukemických buňkách, která se objevila před vznikem *BCR/ABL1* a zůstala dominantní v buňkách periferní krve i po kompletním vymizení *BCR/ABL1* klonu.

6.6.2 Kazuistika 2. – pacient č. 213

Onemocnění CML bylo u nemocného diagnostikováno v srpnu 2009. V době diagnózy byla v karyotypu nemocného prokázána přítomnost Ph chromosomu společně se ztrátou chromosomu Y. Nemocný byl léčen imatinibem v 1. linii. Po 6 měsících došlo k progresi onemocnění s klonálním vývojem karyotypu – byla prokázána přítomnost nadpočetného derivovaného chromosomu 16 v Ph pozitivním klonu. Metodou FISH s lokusově

specifickou sondou LSI inv(16) DC (Abbott Molecular) současně se sondou LSI BCR/ABL DC DF (Abbott Molecular) byla prokázána přítomnost dvou klonů: Ph pozitivního klonu s inverzí chromosomu 16 a druhého Ph pozitivního klonu s nadpočetným der(16)inv(16). Současně s progresí onemocnění byla u nemocného diagnostikována další malignita – chronická lymfatická leukémie (CLL), s genetickými změnami – delecí 13q14 a delecí 11q (delece zahrnovala gen *ATM*). Byla provedena série vyšetření metodou FISH k prokázání přítomnosti klonů, souvisejících s oběma malignitami.

1. Hybridizací s LSI 13q14 (D13S319) (Abbott Molecular) byla prokázána delece 13q14 v 89 % hodnocených buněk.
2. Společnou hybridizací s LSI BCR/ABL DC DF a LSI ATM (11q22.3) (Abbott Molecular) a hodnocením 49 mitóz byla prokázána přítomnost 4 klonů:
 - klonu s normálním nálezem (*BCRx2, ABL1x2, ATMx2*)
 - klonu s fúzí *BCR/ABL1* (fúze na der(9), fúze na der(22), *BCRx1, ABL1x1* a 2 signály oblasti genu *ATM*) bez delece 11q
 - klonu s fúzí *BCR/ABL1* a delecí 11q (*ATM*)(fúze na der(9), fúze na der(22), *BCRx1, ABL1x1* a 1 signál oblasti genu *ATM*)
 - klonu pouze s delecí 11q(*ATM*) (*BCRx2, ABL1x2, ATMx1*)

Pro progresi onemocnění a přechod do blastického zvratu byla terapie imatinibem ukončena, nemocný byl po přípravném režimu transplantován 10 měsíců od stanovení diagnózy. Po 4 měsících došlo k extramedulárnímu relapsu základního onemocnění s postižením submandibulární uzliny. Přítomnost fúzí *BCR/ABL1* v kultivovaných buňkách uzliny byla prokázána metodou interfázní FISH s lokusově specifickou sondou. Nemocný byl přechodně léčen dasatinibem, v současné době je léčba ukončena, u nemocného byla prokázána metodou PCR molekulární negativita *BCR/ABL1* v periferní krvi. Z hlediska CLL je choroba stabilizována, bez terapie.

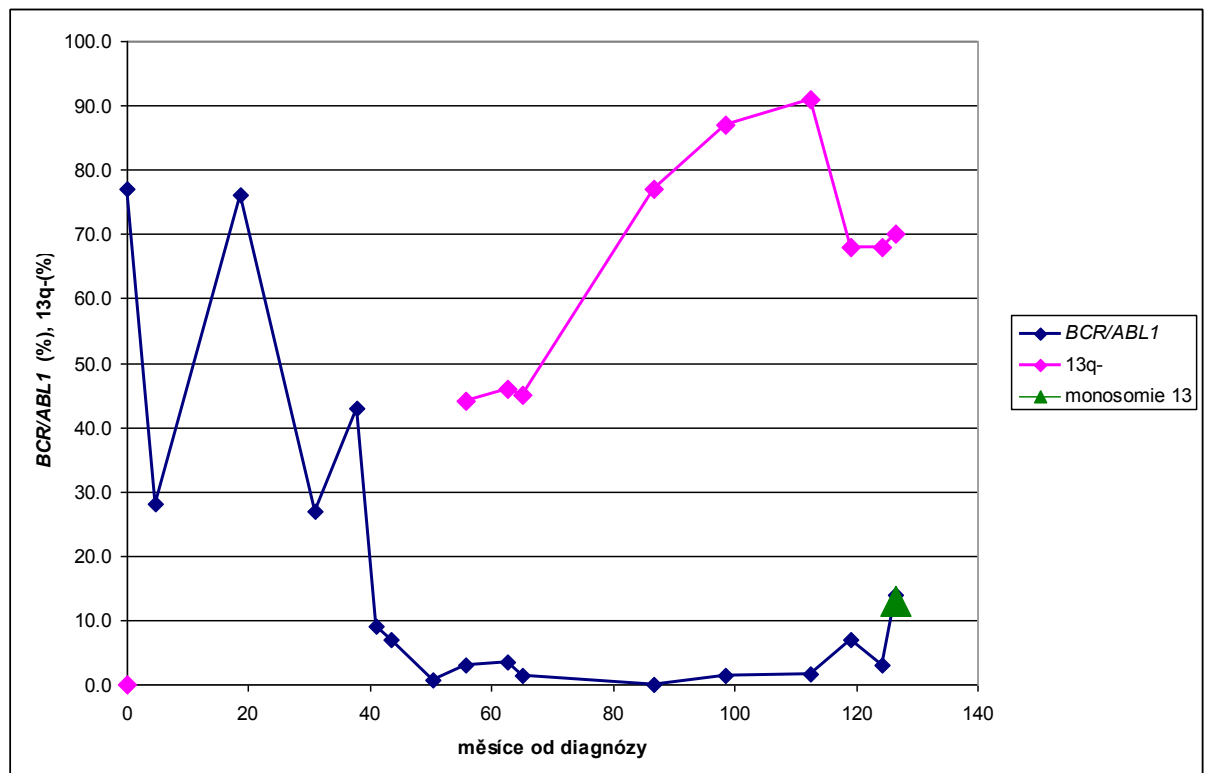
6.6.3 Kazuistika 3. – pacient č. 215

U 71 letého nemocného byla v prosinci 1999 diagnostikována Ph+ CML v chronické fázi s nízkým prognostickým rizikem dle Sokala. Metodou FISH se sondou LSI BCR/ABL ES Abbott Molecular byla prokázána fúze *BCR/ABL1* s delecí 9q. Po cytoredukci litalirem byla zahájena od ledna 2000 léčba IFN- α , která však musela být pro toxicitu po půl roce

přerušena, a nemocný pokračoval v léčbě litalirem v nízkých dávkách. Přibližně po roce léčby litalirem, v červenci 2001 došlo ke zhoršení klinického stavu pacienta, laboratorní výsledky prokázaly bazofilii a trombocytózu, objevily se známky akcelerace onemocnění. Nemocný byl zařazen do léčebné studie s preparátem STI571, která byla zahájena v červenci 2001, dva a půl roku od stanovení diagnózy onemocnění. Počáteční dávkování 600 mg/den bylo pro vedlejší účinky sníženo na 400 mg/den a postupně byla dávka stabilizována na 5x týdně. V únoru 2002 byla léčba pro anémii a jiné zdravotní komplikace (vředová choroba, hypertenze, chronická renální insuficience, plicní hypertenze) dočasně přerušena. Po úpravě hodnot krevního obrazu byla v květnu 2002 léčba STI571 obnovena, zpočátku v nízkých dávkách - 1x týdně, s postupným zvyšováním terapeutických dávek až ke každodennímu dávkování v lednu 2003. V březnu 2003 za trvající hematologické remise došlo k atypickému nálezu lymfocytózy v diferenciálním rozpočtu, která přetrvávala i při dalších vyšetřeních, z hlediska CML však bylo dosaženo velké cytogenetické remise. Opakovaným vyšetřením metodou iFISH v časovém rozmezí od července 2003 do července 2004 byly prokázány hodnoty *BCR/ABL1* nepřesahující 3 %. V červenci 2004, za kompletní cytogenetické remise, byla imunofenotypizačním vyšetřením kostní dřeně (40 % B-lymfocytů CD19+, CD20+, CD23+, CD5+) potvrzena souběžná druhá hematologická malignita – B-chronická lymfatická leukémie ve stadiu Binet A. Molekulárně-cytogenetické vyšetření metodou iFISH prokázalo delecii 13q14 v 44 % hodnocených buněk. CLL byla hodnoceno jako stabilizovaná choroba bez nutnosti terapie.

V květnu 2006 prodělal nemocný cévní mozkovou příhodu, ale pokračoval dále v terapii IM v dávkách 400 mg/denně. V únoru 2008 byl potvrzen cytogenetickým vyšetřením relaps CML – cytogenetickým vyšetřením byly prokázány 3 mitózy s Ph chromosomem z 15 hodnocených, pacient dále pokračoval v terapii IM. V září 2009 byl nemocný hospitalizován na HOK pro celkové zhoršení zdravotního stavu, slabost, dušnost, neschopnost chůze. Pro komplikace byl vysazen IM. Koncem roku 2009 aktuálně došlo k progresi CML i CLL, byla obnovena léčba IM, dále zahájena terapie Prednisonem a Leukeranem v nízkých dávkách. V lednu 2010 byla molekulárně biologicky prokázána mutace F311L v *BCR/ABL1* kinázové doméně. V březnu 2010 byla pro hematologický relaps s trombocytémií ukončena terapie IM a zahájena léčba tyrosinkinázovým inhibitorem 2. generace Sprycelem. Po 14 denním užívání došlo k celkovému zhoršení zdravotního stavu, srdeční slabosti s nutností hospitalizace, terapie Sprycelem byla ukončena

a nemocný byl převeden na terapii hydroxyureou. Pro postupné zhoršování zdravotního stavu s opakovanými atakami dušnosti, srdeční slabosti a opakované febrilie bylo vysloveno podezření na progresi onemocnění, která byla potvrzena cytogenetickým vyšetřením kostní dřeně s nálezem 14 % fúzí *BCR/ABL1*, vzrůstající hodnotou patologického klonu s delecí 13q (70 %) a nově zjištěnou monosomií chromosomu 13. Postupně došlo k celkovému zhoršení zdravotního stavu. V listopadu 2010, 111 měsíců od stanovení diagnózy pacient exitoval. Graf 5 ukazuje hodnoty fúzí *BCR/ABL1*, delecce 13q a monosomie chromosomu 13 v průběhu sledování léčby.



Graf 5: Průběh sledování hodnot *BCR/ABL1*, delecce 13q a monosomie 13 u pac. č. 215

6.6.4 Kazuistika 4. – pacient č. 147

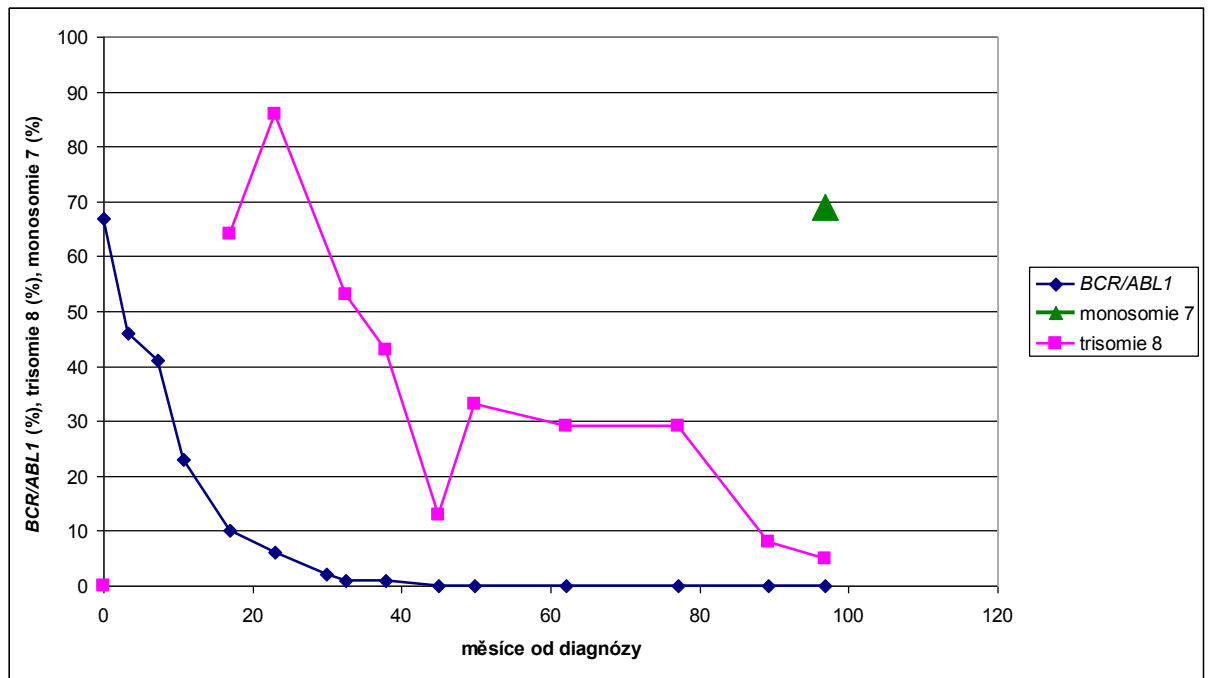
U 68 letého nemocného č. 147 byla Ph+ CML diagnostikována jako duplicitní malignita v červenci 2008. V té době byl nemocný již necelý rok léčen pro B-CLL, náhodně zjištěnou při preventivní prohlídce. Cytogenetickým vyšetřením koncem roku 2007 byla prokázána trisomie chromosomu 12 a parciální delecce 5' IgH genu, molekulárně genetickým vyšetřením byl potvrzen nemutovaný IgVH status. Pro B symptomy byla

nemocnému podána chemoterapie Fludara-cyklofosamid, která byla v červenci 2008 po 1. cyklu pro prokázanou *BCR/ABL1* pozitivitu přerušena a nemocný zahájil od září 2008 po úvodní cytoredukci hydroxyureou terapii IM v dávce 400 mg/den. Po 6 měsících terapie dosáhl kompletní cytogenetické odpovědi. Ve stejném časovém období byl nemocnému diagnostikován tumor plic. Histologickým vyšetřením z bronchoskopie byl prokázán nemalobuněčný nízce diferencovaný karcinom, pacient zahájil v srpnu 2009 chemoterapii Cisplatina, gemzar, která byla ukončena po 4 kúrách v prosinci 2009. Nemocný pokračoval terapií IM 400 mg/denně za dosažení velké molekulární odpovědi, z hlediska CLL byla choroba stabilizovaná, bez léčby, molekulárně cytogenetickým vyšetřením prokázána v dubnu 2010 trisomie chromosomu 12 v 12 % hodnocených buněk. V červnu 2010 byla prokázána generalizace adenokarcinomu do CNS, nemocný podstoupil léčbu radioterapií a byla zahájena biologická terapie Tarcevou. Pro progresi onemocnění plicního adenokarcinomu pacient exitoval 5. 7. 2010.

6.6.5 Kazuistika 5. – pacientka č. 94

Jedná se o 49 letou pacientku, u které byla CML diagnostikována v srpnu 2008 v chronické fázi onemocnění, s vysokým rizikem dle Sokala a Haforda, výraznou splenomegálií, hyperleukocytózou $264 \times 10^9/l$, posunem doleva s 10 % blastických elementů. Cytogenetickým vyšetřením byl potvrzen Ph chromosom bez dalších přídatných chromosomových aberací. U nemocné byla zahájena cytoredukce Litalirem, po kterém se objevila závažná kožní reakce. Nemocná byla převedena v září 2002 na terapii IM, která byla od prosince 2002 do ledna 2003 dočasně přerušena pro pancytopenii, poté bylo zahájeno intermitentní podávání. Po 16 měsících od zahájení léčby IM, v lednu 2004, byla při kontrolním cytogenetickém vyšetření prokázána v Ph negativních buňkách trisomie chromosomu 8, která přetrvává i při dalších vyšetřeních. V květnu 2006 dosáhla pacientka kompletní cytogenetické remise, v dubnu 2008 velké molekulární remise za perzistence +8. Pacientka je klinicky stabilizovaná, jednorázově došlo ke krátkodobému přerušení Glivecu pro neutropenii. V září byl prokázán rozvoj MDS RCMD s bicytopenií, trilineární dysplázií a monosomií chromosomu 7, při současném trvání velké molekulární odpovědi CML. V současné době je nemocná v předtransplantační přípravě s plánovanou transplantací krevetvorných buněk od nepříbuzného dárce v lednu roku 2011. Následující

Graf 6. uvádí zastoupení klonu s fúzí *BCR/ABL1*, Ph negativního klonu s +8 a monosomií 7.



Graf 6: Průběh sledování hodnot *BCR/ABL1*, trisomie chromosomu 8 a monosomie chromosomu 7 u nemocné č. 94.

7 DISKUSE

Cytogenetika a molekulární cytogenetika CML má i v době cílené léčby inhibitory tyrosinových kináz stále diagnostický, léčebný i prognostický význam.

Cílem disertační práce bylo provést cytogenetickou a molekulárně cytogenetickou analýzu souboru nemocných s CML, diagnostikovaných a léčených v různých fázích onemocnění odlišnými léčebnými přístupy, určit frekvenci a typy chromosomových změn a vyhodnotit klinický význam cytogenetiky pro prognózu a celkové přežití nemocných.

Práce popisuje cytogenetickou a molekulárně cytogenetickou analýzu souboru 256 nemocných, diagnostikovaných a léčených na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc v letech 1990-2010. Soubor tvořilo celkem 237 nemocných, u kterých byla známa diagnostická cytogenetická data. U celkem 19 nemocných se nám nepodařilo zjistit cytogenetická data v době diagnózy CML, neboť tyto nemocní byli diagnostikováni a někteří i primárně léčení na jiných pracovištích, ale v jejich léčbě a sledování pak pokračovalo naše pracoviště.

Všichni nemocní byli cytogeneticky a molekulárně cytogeneticky vyšetřeni v průběhu onemocnění.

Pouze Ph chromosom v době diagnózy CML byl pozorován u 193 (81,5 %) nemocných, z nich u 14 (4,7 %) jako výsledek variantní translokace s nejčastěji zahrnutými chromosomy 1, 2, 6, 7 a 12. Frekvence variantní translokace v našem souboru odpovídá literárním údajům, které udávají frekvenci variantních translokací 5-10 % (Stopera 1990, Valencia 2009, 7,8 % Bernstein 1984, 6 % El-Zimaity 2004, Johansson 2002). Podle literárních pozorování nejčastěji do variantní translokace vstupují chromosomy 3, 11, 12, 14 a 17 (Fitzerald 1991), což z výsledku našeho malého souboru nelze jednoznačně potvrdit. Vzhledem k malému souboru nemocných s variantní translokací nelze přesně vyhodnotit jak četnost jednotlivých chromosomů vstupujících do translokace, tak nelze hodnotit prognostický význam variantní translokace. Lze jen říci, že 9 z 10 nemocných bez přídatných změn odpovídalo na léčbu a dosáhlo cytogenetické i hematologické odpovědi (Tabulka 11). To potvrzuje pozorování El-Zimaity (2004), který na analýze souboru 721 nemocných léčených IM neprokázal vliv variantních translokací na léčebnou odpověď, trvání odpovědi ani vliv na celkové přežití nemocných.

Přídavné chromosomové změny byly nalezeny u 44 (18,5 %) nemocných v době diagnózy CML, z toho 22 (9,5 %) nemocných bylo při zahájení léčby IM v chronické fázi onemocnění. To odpovídá literatuře, která uvádí 10 % frekvenci přídavných změn v chronické fázi onemocnění (Kantarjian 1995). Prognostický význam přídavných chromosomových změn nebyl z důvodů nízkého počtu nemocných a různým léčebným přístupům statisticky hodnocen.

Hodnocení celého souboru nemocných nezávisle na typu léčby ukázalo, že z celkového počtu 256 nemocných žije s mediánem přežití 81,5 měsíců celkem 161 (62,9 %) nemocných. Na základě použité léčby nemocných jsme celý soubor 256 CML nemocných rozdělili do 4 terapeutických podskupin (Tabulka 6).

Skupina 60 nemocných léčených **IM v 1. linii** byla tvořena pouze nemocnými v chronické fázi (CF) onemocnění. Křivka celkového přežívání ukazuje, že během prvních 24 měsíců od zahájení léčby zemřelo 8 nemocných. Analýza příčin úmrtí však ukázala, že pouze dva z 8 nemocných zemřeli v souvislosti s CML. Jeden nemocný přešel v průběhu 4 měsíců náhle do blastického zvratu a v jeho důsledku zemřel, druhý nemocný i přes převedení na vyšší dávky IM zemřel na progresi v blastické zvratu onemocnění za 20 měsíců od diagnózy. Pět nemocných zemřelo na komorbiditu a jeden nemocný v důsledku suicidia. Křivka přežívání nemocných léčených IM v chronické fázi onemocnění v 1. linii ukazuje po 3 letech plateau, shodně s údaji v literatuře (O'Brien, 2008; Hochhaus, 2008).

Hodnocení cytogenetické odpovědi u těchto 60 nemocných ukázalo, že 45 (75 %) nemocných dosáhlo CCyR, 30 z nich MMR a 10 CMR. Výsledky jsou v souladu s daty publikovanými v literatuře (Hochhaus, 2008). Účinnost IM v 1. linii léčby byla potvrzena i ve studii autorů de Lavallade a kolektivu (2008). Analýzou 204 nemocných s nově diagnostikovanou CML v CF s mediánem sledování 38 měsíců potvrdili dosažení kompletní cytogenetické odpovědi u 77 % nemocných. Studie Pavlovskeho (2009) ukázala, že s mediánem sledování 18 měsíců žije 95 % pacientů a že jen 11 % nemocných léčených IM v 1. linii má progresi do AF nebo BZ. V našem souboru s mediánem přežívání 39,3 měsíců žije celkem 52 (86,6 %) nemocných, 8 nemocných zemřelo, ale jen dva v souvislosti s CML.

Kromě Ph chromosomu v době diagnózy byly u 11 našich nemocných určeny přídavné chromosomové změny, u 4 nemocných se přídavné změny vyvinuly na léčbě, v Ph+ klonu. Odpověď na léčbu dosáhli i nemocní s přídavnými změnami, pouze jeden nemocný s vývojem dalšího Ph chromosomu zemřel na progresi onemocnění. Na základě

hodnocení tohoto malého počtu nemocných můžeme říct, že výrazný vliv přídatných chromosomových změn na léčebnou odpověď v našem souboru nebyl pozorován. Všichni nemocní s přídatnými změnami při nasazení IM žijí, kromě jednoho, který nezemřel v souvislosti s CML. Z 8 nemocných s vývojem dalších změn na léčbě IM zemřeli dva nemocní, pouze jeden však v souvislosti s progresí CML. Hodnocení vlivu sekundárních chromosomových změn na léčebnou odpověď byla předmětem řady studií (Mohamed, 2003; O'Dwyer, 2002; Schoch, 2003). Schoch se spolupracovníky (2003) ukázali, že u nemocných s přídatnými změnami určenými před léčbou IM není pozorována odlišná odpověď ve srovnání s nemocnými, kteří mají při zahájení léčby jen Ph chromosom. Tito autoři dokonce popsali, že přítomnost přídatných změn nemá význam pro předpověď resistance k léčbě IM. O'Dwyer (2002) pozoroval, že nemocní s přídatnými změnami před léčbou IM mají excelentní odpověď na léčbu.

Skupinu nemocných léčených **IM ve druhé linii** tvořilo 119 nemocných. Celkem 70 (58,8 %) jich bylo při zahájení léčby v chronické fázi onemocnění. Vstupní cytogenetická data byla známa u 107 nemocných. Pouze Ph chromosom při diagnóze CML mělo 81 (68,1 %) nemocných a 26 (21,8 %) mělo přídatné chromosomové změny. Z celkem 119 nemocných léčených IM ve druhé linii dosáhlo 67 nemocných CCyR. V CF při zahájení léčby IM bylo 70 nemocných a CCyR dosáhlo 48 (68,6 %) nemocných, což se blíží hodnotám dosažených CCyR u nemocných léčených v 1.linii IM. Přídatné změny mělo 11 nemocných v CF a celkem 8 nemocných dosáhlo CCyR.

V AF a BZ bylo 49 nemocných a CCyR dosáhlo 19 (38,7 %) nemocných. Přídatné změny v AF a nebo v BZ byly pozorovány u 15 (30,6 %) nemocných, CCyR dosáhlo 9 nemocných. Tyto nálezy odpovídají již publikovaným výsledkům. Otero (2007) analýzou malého souboru 48 nemocných léčených IM v CF (16 nemocných mělo přídatné změny) ve 2. linii léčby ukazuje, že přídatné chromosomové změny jsou spojené s nižším počtem cytogenetických odpovědí a snižují celkové přežití. Tito autoři dále pozorovali, že trisomie chromosomu 8, del(3) a variantní Ph byly spojeny s velkou a malou cytogenetickou odpovědí, zatímco další Ph chromosom, del(17) a změna chromosomu 2, byly pozorovány u nemocných, kteří byli resistantní na IM. Vzhledem k malému počtu nemocných nelze význam přídatných změn u této skupiny přesně určit, avšak tendence k méně optimální odpovědi je zřejmá.

Hodnocení celkového přežívání nemocných bez přídatných změn (93 nemocných) a nemocných s nepříznivými přídatnými změnami (5 nemocných) naznačuje jejich

nepříznivou prognózu – zemřeli celkem 4 z 5 nemocných. V souboru nemocných léčených IM ve 2.linii zemřelo celkem 34 (28,6 %) nemocných, z toho 14 nemocných s přídatnými změnami.

U 24 nemocných se v průběhu léčby vyvinuly další chromosomové změny. Jednalo se o výskyt trisomie chromosomu 8 u 7 nemocných, další Ph chromosom u 3 nemocných, isochromosom i(17) u jednoho nemocného, komplexní přestavby u 8 nemocných a o ostatní změny u 5 nemocných. Z těchto 24 nemocných zemřelo 13 (54,1 %). Studie O'Dwyera a spol. (2004) ukázala, že hlavním prognostickým faktorem pro relaps onemocnění je přítomnost klonálního vývoje a nedosažení velké cytogenetické odpovědi. Na souboru 141 nemocných ukázali, že nemocní s klonálním vývojem (22 nemocných) měli signifikantně vyšší riziko progresu (50 %) ve srovnání s nemocnými bez klonálního vývoje.

Hodnocení cytogenetického vývoje v 1. a 2. linii léčby IM ukázalo rozdíl v neprospěch nemocných léčených IM ve 2.linii léčby, kde se u 24 vyvinuly přídatné chromosomové změny zatímco u nemocných léčených IM v 1.linii jen u 4 nemocných.

Analýza soubor 699 nemocných s Ph⁺ CML z databáze CAMELIE (nepublikovaná data) tvořená 379 nemocnými léčenými IM v 1. linii a 193 nemocných léčených ve 2. linii léčby také ukázala rozdílný výskyt cytogenetické progresu u nemocných léčených IM ve 2.linii (11,9 %) ve srovnání s léčbou IM 1.linie (5,2 %).

Analyzovali jsme také nemocné, kteří byli **léčeni jinou léčbou než IM**. Tento soubor tvořila heterogenní skupina nemocných s různou délkou léčby INF- α , hydroxyureou a/nebo kombinací INF- α s AraC. V této skupině jsme analyzovali 56 nemocných s průměrnou délkou sledování 43,3 měsíců. U 5 nemocných byly v době diagnózy pozorovány přídatné změny a u jiných 5 nemocných se přídatné změny vyvinuly v průběhu léčby. Podle výsledku hodnocení celkového přežívání (Graf 3) tvoří tyto nemocní prognosticky nepříznivou skupinu, ve které 50 (89,3 %) nemocných zemřelo s mediánem celkového přežití 38,5 měsíců. CCyR dosáhlo pouze 6 nemocných, kteří žijí 138,9 měsíců od diagnózy onemocnění.

Studie nemocných léčených INF- α ukázaly, že touto léčbou může být dosažena cytogenetická odpověď a její dosažení může sloužit jako časný marker dlouhodobého přežívání (Talpoz, 1991). Práce Kantarjiana (2003) ukázala, že 78 % nemocných léčených INF- α , kteří dosáhli CCyR žije 10 a více let. To platí i pro našich 6 nemocných.

Samostatně jsme hodnotili skupinu nemocných léčených **alogenní TKB**. Jednalo se o celkem 21 nemocných. Dva nemocní měli před TKB přídatné chromosomové změny. Z 21 alogenně transplantovaných nemocných žije celkem 16 nemocných s mediánem sledování 109,8 měsíců. CCyR dosáhlo 14 nemocných, dva nemocní nedosáhli léčebné odpovědi. Zemřelo celkem 5 nemocných, 3 na peritransplantační komplikace, dva nemocní na komplikace GVHD.

Společně se skupinou nemocných léčených IM v první linii léčby potvrzují výsledky léčby alogenních transplantací, že alogenní transplantací krvetvorných buněk je možno nemocné s CML vyléčit, ale největším rizikem této metody je peritransplantační mortalita. Proto jsou u nemocných v chronické fázi CML v současnosti lékem 1. linie inhibitory tyrosinových kináz.

Cílem této práce bylo také vyhodnotit frekvenci a význam **přídavných chromosomových změn**, které byly cytogeneticky nebo molekulárně cytogeneticky určeny u sledované skupiny nemocných.

Přídavné chromosomové změny jsou u CML nenáhodné a jsou pozorovány u 10 % CML nemocných v době diagnózy (Shtivelman 1985, Kantarjian 1995), a až u 60-80 % nemocných v blastické fázi onemocnění (Johansson 2002).

Jednou z hodnocených přídavných chromosomových změn, která se vyskytuje v době diagnózy CML, byla **delece na dlouhých ramenech derivovaného chromosomu 9** určená pomocí metody FISH.

Delece na derivovaném chromosomu 9 se vyskytuje u 10-15 % nemocných se standardní Ph translokací (Sinclair, 1997, 2000; Herens, 2000; Huntly, 2001, 2003) a více jak u 30 % nemocných s variantní Ph translokací (Huntly, 2001).

V našem souboru byla nalezena delece u 14 nemocných (6,4 %), což je nepatrně nižší hodnota, než uvádějí práce jiných autorů. Některé práce uvádí medián věku nemocných s delecí nižší než u nemocných bez delece (Castagnetti, 2010). Podobný rys jsme zaznamenali i v našem souboru – medián věku nemocných s delecí byl 45,5 roků (rozmezí 17-71), zatímco medián věku nemocných bez delece byl 52 roků (rozmezí 17-83).

Nejčastějším typem delece je delece na obou chromosomech, které vstupují do translokace – der(9) a der(22), druhou nejčastější je delece pouze na der(9) a poměrně vzácný je výskyt delece pouze na 22q. Fourouclas a spoluautoři analyzovali v roce 2006 ve své práci 69 nemocných s delecí na 9q. Deleci na obou chromosomech 9q-/22q- prokázali

u 53 nemocných (77 %), delecí pouze na 9q u 13 nemocných (19 %) a delecí na 22q u tří nemocných (4 %).

Mezi našimi 14 nemocnými bylo 64 % nemocných s delecí na obou chromosomech 9q-/22q-, 29 % pouze s delecí 9q a pouze jeden nemocný (7 %) s delecí 22q, což je podobná tendence ve výskytu delecí jako u jiných autorů. Rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých variant delecí mohou být způsobeny malým počtem nemocných s delecí 9q v našem souboru.

Pro nemocné léčené hydroxyureou nebo IFN- α představuje delece 9q riziko nepříznivé prognózy (Huntly, 2001; Kolomietz, 2001). V našem souboru pouze 1 nemocná byla léčena IFN- α , krátce po zahájení léčby přešla do blastického zvratu a zemřela 5 měsíců od diagnózy onemocnění.

Prognostický význam delece 9q u nemocných s CML v CF léčených IM byl také publikován. Huntley a kol. popsali v roce 2003 ve své práci soubor 275 nemocných s CML v CF. 51 (19 %) nemocných bylo nově diagnostikovaných a 224 (81 %) bylo v pozdní CF po selhání léčby IFN- α . Počty nemocných s dosaženou kompletní hematologickou remisí, velkou cytogenetickou remisí a kompletní cytogenetickou remisí byly nižší u nemocných s delecí než u nemocných bez delece, také doba bez progresu onemocnění byla signifikantně kratší u nemocných s delecí než bez delece (Huntley, 2003). Na rozdíl od těchto závěrů neprokázaly další dvě studie rozdíly v odpovědi na léčbu a přežití mezi nemocnými s a bez delece (Quintas-Cardama, 2005; Kim 2008). Quintas-Cardama a kol. publikovali 320 nemocných (152 v časně CF a 168 v pozdní CF), v druhé práci popsali Kim a spolupracovníci 141 nemocných (71 v časně CF a 70 v pozdní CF). Molekulární remise byla hodnocena pouze v práci Kim a spoluautorů. V souhrnu se dá říct, že výsledky předchozích dvou publikovaných studií jsou do jisté míry konfliktní a uváděné počty nemocných v časně CF jsou relativně nízké pro objektivní zhodnocení prognostického významu delece 9q. Publikace analyzující prognostický význam delece 9q, která byla detekována pomocí metody FISH stanovila frekvenci delece u 12 % CML nemocných v časně CF CML léčení IM a potvrdila, že delece není nepříznivým prognostickým faktorem u těchto nemocných (Castagnetti, 2010). Z našich nemocných s delecí 9q byli pouze dva léčeni IM v časně CF a oba dosáhli CCyR a MMR. 11 nemocných bylo léčeno IM po selhání jiné léčby a 10 z nich dosáhlo CCyR, jeden PCyR a pouze 1 nemocný zemřel v souvislosti s progresí onemocnění 131 měsíců od diagnózy CML. Jeden nemocný

byl léčený INF- α , dosáhl pouze minimální odpovědi na IM a zemřel 20 měsíců od diagnózy CML.

Novější studie uvádějí, že zavedením léčby IM může být nepříznivý prognostický efekt této delecce částečně překonán. Léčba IM navozuje CCyR u 70 % nemocných s 9q+ delecí, včetně nemocných s přídatnými změnami. Zdá se, že není rozdíl v celkovém přežití a odpovědi na léčbu u nemocných s delecí a bez delecce, pokud jsou léčeni IM (Quintas-Cardama, 2005.)

K takzvaným „minor route“, neboli malým změnám s frekvencí pod 5 % patří i **komplexní změny**, definované jako nálezy tří a více chromosomových změn v karyotypu. Komplexní změny karyotypu jsou u nemocných s CML pozorovány velmi vzácně a jejich význam v patogenezi onemocnění je proto stále nejasný (Mitelman, 1992). Věří se, že výskyt komplexních karyotypů u CML je odrazem nestability nádorového genomu, a že je spojen s nepříznivou prognózou nemocných (Harrison, 2000).

V našem souboru 256 CML nemocných jsme potvrdili komplexní karyotyp u 6 (2,3 %) nemocných v době diagnózy CML. Bylo pozorováno, že komplexní změny karyotypu jsou spojené s výskytem různých kombinací chromosomových přestaveb - nejčastěji trisomií, monosomií a dalších přestaveb. Nejčastěji se vyskytuje kombinace +8, +Ph a i(17q). Přídatný Ph chromosom s trisomií 8 byl pozorován u dvou nemocných naší sestavy, další Ph chromosom společně se ztrátou chromosomu Y u jednoho nemocného. Celkem u tří nemocných byla součástí komplexních karyotypů hyperploidie s počtem 48-66 chromosomů. Součástí komplexních přestaveb byly také nové translokace – t(2;11) u jedné nemocné a translokace t(7;9) u jiné nemocné. Nízké procento výskytu komplexních změn v době diagnózy bylo pozorováno i v práci Babické a spol. (2006), kteří popsali výskyt komplexních přestaveb u 18 z 200 analyzovaných CML nemocných, z toho u 14 nemocných v chronické fázi onemocnění.

Nálezy komplexních karyotypů jsou považovány za známku nepříznivé prognózy i u CML. Analýza klinického průběhu onemocnění našich 6 nemocných ukázala, že 5 nemocných zemřelo. Žije pouze jeden nemocný 120 měsíců od diagnózy po úspěšné alogenní transplantaci kostní dřeně.

V souvislosti s úspěšnou léčbou nemocných inhibitory tyrosinových kináz se objevil nový cytogenetický fenomén, nálezy přídatných **chromosomových změn v Ph negativním (Ph-) klonu**. Protože počáteční pozorování byla popsána u nemocných, kteří byli předlčeni různou chemoterapií, dával se výskyt těchto změn do souvislosti s předchozí léčbou. Řada

následujících pozorování u nemocných léčených IM v první linii souvislost výskytu změn s přechodí léčbou nepotvrdila. Stále se předpokládá, že účinná léčba IM a potlačení Ph positivity vede k „odmaskování“ Ph negativního klonu, který může být odrazem nestability CML genomu a může předcházet vzniku Ph+ klonu (Lin, 2006). Významné je, že existují pozorování o výskytu chromosomových změn v Ph- klonu, které jsou však transientní a nebyl zatím prokázán jejich klinický význam (Jabbour, 2007). Spekuluje se, že IM sám může tyto změny indukovat. V našem analyzovaném souboru bylo celkem 10 nemocných s vývojem změn v Ph- klonu. Jednalo se o nález trisomie chromosomu 8 u 4 nemocných, pouze u jednoho byla trisomie transientní. U 4 mužů jsme pozorovali ztrátu chromosomu Y, u jednoho nemocného jsme nadpočetný marker chromosom přesně neurčili. U jedné nemocné byla komplexní translokace nalezena v Ph- klonu a byla spojena s výskytem jiné myeloproliferace. Literatura uvádí výskyt přídatných změn v Ph- klonu u CML nemocných, kteří vyvinuli druhou malignitu – MDS, a u kterých byla prokázána trisomie chromosomu 8 nebo monosomie chromosomu 7 (Bacher, 2005). Vývoj MDS byl v našem souboru pozorována pouze u jedné nemocné a celková frekvence výskytu v našem souboru odpovídá literatuře.

8 SOUHRN

Chronická myeloidní leukémie je klonální myeloproliferativní onemocnění, charakterizované specifickou chromosomovou změnou – translokací $t(9;22)(q34;q11)$ se vznikem fúzního genu *BCR/ABL1*. Produktem genu *BCR/ABL1* je protein Bcr/Abl1, jehož konstitutivní aktivací dochází k deregulaci signálních drah a buněčných procesů vedoucí k nádorové transformaci buňky.

Práce ukazuje výsledky cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy souboru 256 nemocných s *BCR/ABL1* pozitivní CML. Byly hodnoceny nálezy a frekvence přídatných chromosomových změn v době diagnózy onemocnění a vývin chromosomových změn v průběhu léčby onemocnění, jejich prognostický a léčebný význam.

Cytogenetická analýza v době diagnózy onemocnění, případně cytogenetické vyšetření při léčbě onemocnění a metoda FISH prokázala vznik Ph chromosomu klasickou translokací $t(9;22)(q34;q11)$ u 242 (94,5 %) nemocných, z toho u 2 nemocných byl prokázán tzv. maskovaný Ph chromosom, u 14 (5,5 %) nemocných byla potvrzena variantní translokace $t(9;22;V)$. Pouze Ph chromosom bez dalších chromosomových změn v karyotypu byl prokázán u 193 (81,4 %) nemocných, přídatné změny byly potvrzeny u 44 (18,6 %) nemocných z celkem 237 nemocných s úspěšnou cytogenetikou. Nejčastějšími přídatnými chromosomovými změnami byla delece 9q u 14 (31,8 %) nemocných, přídatný Ph chromosom u 4 nemocných (9,1 %), ztráta chromosomu Y u 4 mužů (9,1 %), trisomie chromosomu 8 u 2 nemocných (4,5 %), isochromosom dlouhých ramen chromosomu 17 u 2 (4,5 %) nemocných, a další náhodné změny u 12 (27,3 %) nemocných. U 6 (2,7 %) nemocných byl prokázán komplexní karyotyp, z nich 5 nemocných zemřelo, žije pouze jeden nemocný po úspěšné TKB.

V průběhu léčby byly přídatné chromosomové změny nalezeny u 39 (15,2 %) nemocných, z nich 27 (69,2 %) mělo při diagnóze pouze Ph chromosom, u 6 (15,4 %) nebyla cytogenetická data při diagnóze známa a 6 (15,4 %) nemocných mělo přídatné změny již při diagnóze onemocnění. U 11 (28,2 %) z 39 nemocných se jednalo o změny v Ph negativním klonu, z nich u dvou v souvislosti s vývojem 2. malignity. U 12 (30,8 %) z 39 nemocných byl potvrzen komplexní karyotyp. Celkem 8 (66,7 %) nemocných s komplexním karyotypem zemřelo.

Z celkem 166 (64,8 %) nemocných s pouze Ph chromosomem při diagnóze i průběhu léčby, dosáhlo CCyR 105 (63,3 %) nemocných, 31 (18,7 %) dosáhlo PCyR, MinorCyR a MinimalCyR a 30 (18,1 %) nemocných na léčbu neodpovědělo. Žije 113 nemocných (68,1 %), 53 (31,9 %) zemřelo.

Neprokázali jsme vliv variantní translokace (14 nemocných) na léčebnou odpověď a celkové přežití stejně jako jsme neprokázali vliv delece 9q (14 nemocných) na dosažení cytogenetické odpovědi (CCyR dosáhlo 12 nemocných) a celkové přežití (všichni nemocní žijí).

Ani trisomie chromosomu 8 jako samostatná přídatná změna určená při diagnóze nebo v průběhu léčby CML (13 nemocných) nevykazovala vliv na léčebnou odpověď. Pouze 2 nemocní neodpověděli na léčbu, u jednoho byl pozorován transientní výskyt +8.

Pro hodnocení léčebné odpovědi a celkového přežití v závislosti na výskytu chromosomových změn byl analyzovaný soubor nemocných rozdělen podle typu použité léčby do 4 podskupin: skupina 60 (23,4 %) nemocných léčených IM v 1. léčebné linii, 119 (46,5 %) nemocných léčených IM ve 2. léčebné linii, 21 (8,2 %) nemocných po alogenní transplantaci krvetvorných buněk a poslední skupinu tvořilo 56 (21,9 %) nemocných léčených jiným typem léčby.

Při léčbě IM v 1.linii dosáhlo cytogenetickou odpověď 52 (86,7 %) nemocných, 8 (13,3 %) zemřelo, z toho pouze 2 na progresi onemocnění. Celkem 52 (76,7 %) nemocných žije s mediánem 39,3 měsíců.

IM ve 2. linii bylo léčeno 119 nemocných. Cytogenetickou odpověď dosáhlo 83 (69,7 %) nemocných, z toho CCyR 67 nemocných, zemřelo 34 (28,6 %) nemocných.

Z celkem 21 nemocných, kteří byli léčeni TKB, žije v kompletní cytogenetické odpovědi 14 (66,7 %) nemocných, 5 (23,8 %) nemocných zemřelo na komplikace TKB.

Z celkem 56 nemocných léčených jiným typem terapie žije pouze 8 (14,3 %) nemocných s mediánem sledování 138,9 měsíců. CCyR dosáhlo pouze 6 (10,7 %) nemocných.

Vliv přídatných chromosomových změn v jednotlivých léčebných podskupinách nebyl pro malý počet nemocných s přídatnými změnami statisticky hodnocen. Lze však říci, že nemocní s komplexním karyotypem, jak v době diagnózy, tak v průběhu onemocnění a nemocní s dalším Ph chromosomem představují nejrizikovější podskupinu CML nemocných i v éře TKI.

Statistická analýza prokázala, že nejúčinnějším léčebným přístupem u nemocných v CF CML je léčba IM v první linii a TKB, neboť přežívá 86,7 % a 76,2 % nemocných a CCyR dosáhlo 86,5 % a 87,5 % žijících nemocných.

Z celkového počtu 256 nemocných v souboru žije 161 nemocných (62,9 %) s mediánem přežití 81,5 měsíců. Zemřelo 95 nemocných (37,1 %) s mediánem přežití 41,3 měsíců.

Byl potvrzen diagnostický, léčebný a prognostický význam cytogenetiky a molekulární cytogenetiky u nemocných s CML v době úspěšné léčby TKI.

9 SUMMARY

Chronic myeloid leukemia is a clonal myeloproliferative disease characterized by specific chromosomal abnormality - translocation $t(9;22)(q34;q11)$ associated with formation of fusion gene *BCR/ABL1*. Constitutive activation of protein Bcr/Abl1, a product of *BCR/ABL1* gene, results in deregulation of signal pathways and cellular processes leading to a tumor transformation of cell.

The study shows results of cytogenetic and molecular-cytogenetic analysis in a series of 256 patients diagnosed with *BCR/ABL1* positive CML. We evaluated the occurrence and frequency of additional chromosomal abnormalities at the time of disease diagnosis, the development of chromosomal aberrations during disease treatment and their prognostic and therapeutic importance.

Cytogenetic analysis at the time of disease diagnosis, eventually during disease treatment, and FISH method detected the origination of Ph chromosome by classical translocation $t(9;22)(q34;q11)$ in 242 (94,5 %) patients, in 2 out of them so-called masked Ph chromosome was found, the variant translocation $t(9;22;V)$ was proved in 14 (5,5 %) patients. Single Ph chromosome without additional chromosomal changes in karyotype was detected in 193 (81,4 %) patients, additional chromosomal aberrations were confirmed in 44 (18,6 %) out of the total of 237 patients with successful cytogenetic analysis. The most frequent chromosomal changes were deletion of the 9q in 14 (31,8 %) patients, additional Ph chromosome in 4 (9,1 %) patients, loss of the chromosome Y in 4 (9,1 %) male patients, trisomy of the chromosome 8 in 2 (4,5 %) patients, isochromosome consisting of the long arms of chromosome 17 in 2 (4,5 %) patients. Other non-recurrent abnormalities were found in 12 (27,3 %) patients. A complex karyotype was proved in 6 (2,7 %) patients, 5 out of them died, only one patient is alive after successful hemopoietic stem cell transplantation.

Additional chromosomal abnormalities occurred in 39 (15,2 %) patients during disease treatment, 27 (69,2 %) out of them presented with single Ph chromosome at the diagnosis, 6 (15,4 %) out of them had no cytogenetic data available at the diagnosis and 6 (15,4 %) patients displayed the additional chromosomal changes already at the time of disease diagnosis. The additional chromosomal abnormalities arose in Ph negative clone in 11 (28,2 %) out of 39 patients, in 2 of them their occurrence was associated with secondary

malignity. A complex karyotype was confirmed in 12 (30,8 %) out of 39 patients. Altogether 8 (66,7 %) out of 12 patients with a complex karyotype died.

CCyR was achieved by 105 (63,3 %) patients out of 166 (64,8 %) patients with single Ph chromosome at the time of diagnosis and during disease treatment, whereas 31 (18,7 %) patients reached for only PCyR, MinorCyR or MinimalCyR and 30 (18,1 %) patients did not respond to the treatment at all. 113 (68,1 %) patients is alive, 53 (31,9 %) patients died. We did not observe influence of variant translocations (14 patients) to the therapeutic response and overall survival, as well as we did not proved impact of deletion 9q (14 patients) on the achievement of cytogenetic response (CCyR achieved by 12 patients) and overall survival (all patients alive).

Even trisomy of chromosome 8 as a single additional aberration detected at the time of diagnosis or during treatment of CML (13 patients) did not show the impact on therapeutic response. Only 2 patients did not respond to the therapy, the transient occurrence of trisomy 8 was detected in 1 out of them.

To evaluate therapeutic response and overall survival in the dependence on chromosomal aberrations we divided our series of analyzed patients into 4 subgroups according to the type of used therapy:

subgroup of 60 (23,4 %) patients treated with IM as the first-line therapeutic approach; subgroup of 119 (46,5 %) patients treated with IM as the second-line therapeutic approach; subgroup of 21 (8,2 %) patients treated with alogenic transplantation of hemopoietic stem cells; and the last subgroup was composed of 56 (21,9 %) patients treated with other therapeutic approach.

By the treatment with IM as the first-line therapeutic approach the cytogenetic response was achieved by 52 (86,7 %) patients, 8 (13,3 %) patients died, interestingly only 2 out of them died of disease progression. Altogether 52 (76,7 %) patients are alive with median survival of 39,3 months.

119 patients were treated with IM as the second-line therapeutic approach. Cytogenetic response was achieved by 83 (69,7 %) patients, 67 patients out of them acquired CCyR, 34 (28,6 %) patients died.

The total of 21 patients underwent hemopoietic stem cell transplantation. 14 (66,7 %) patients out of them are alive with complete cytogenetic response, 5 (23,8 %) patients died of transplant complications.

Only 8 (14,3 %) patients out of 56 ones treated with other therapeutic approach are alive with median of 138,9 months. CCyR was achieved only by 6 (10,7 %) patients.

The impact of additional chromosomal aberrations in different subgroups was not evaluated statistically because of low number of patients with such additional changes. Nevertheless we can state, that patients with a complex karyotype detected at the time of diagnosis as well as during disease course, and patients with additional Ph chromosome represent the most risky subgroup of CML even in the era of TKI.

Based on statistical analysis we proved that the most efficient therapeutic approaches for the patients in chronic phase of CML were the treatment with IM as a first-line therapy and hemopoietic stem cell transplantation. 86,7 % and 76,2 % of patients, respectively, survived and out of them 86,5 % and 87,5 % of patients achieved CCyR.

Out of total of 256 analyzed patients in our series, 161 (62,9 %) patients are alive with median survival 81,5 months. 95 (37,1 %) patients died with median survival 41,3 months.

We confirmed diagnostic, therapeutic and prognostic importance of cytogenetic and molecular cytogenetic investigations of patients diagnosed with CML in the time of successful treatment with TKI.

10 PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

aCGH	array komparativní genomová hybridizace
AF	akcelerovaná fáze
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ATP	adenosintrifosfát
BAC	bacterial arteficial chromosome (umělé bakteriální chromosomy)
BCR	breakpoint cluster region (oblast zlomu na 22. chromosomu)
BZ	blastický zvrát
c-ABL	lidský homolog genu v-ABL, myšího onkogenního viru (Ab-MuLV, Abelson Murine Leukemia Virus)
CCD	charge coupled device (prvek s nábojovou vazbou)
CCyR	complex cytogenetic remision (kompletní cytogenetická remise)
CD	Cluster Designation, CD molekuly
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (cyklin-dependentní inhibitor kinázy 2A)
CF	chronická fáze
CFU-GM	Colony-Forming Unit Granulocyte-Monocyte (jednotka tvořící kolonie granulocytů, monocytů)
CGH	komparativní genomová hybridizace
CLL	chronická lymfatická leukémie
CLP	Common Lymphoid Progenitor (společný lymfoidní progenitor)
CML	chronická myeloidní leukémie
CMR	complete molecular remission
CMP	Common Myeloid Progenitor (společný myeloidní progenitor)
DAPI II	4',6-diamidino-2-phenylindole (fluorescenční barvivo)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EFS	event free survival (přežití bez události)
ELN	European Leukemia Net (Evropská leukemická síť)
EPO	erythropoetin

FAB	Francouzsko-americko-britská morfoloická klasifikace
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FITC	fluorescein-izothiokyanát
G-CSF	granulocytární kolonie stimulující faktor
GM-CSF	granulocytární/makrofágový kolonie stimulující faktor
GMP	granulocytární/makrofágový progenitor
GSK3 β	glykogensyntázová kináza 3beta
GvHD	Graft versus host disease (reakce štěpu proti hostiteli)
HLA	Human Leukocyte Antigens (lidský leukocytární antigen)
HSCs	Hematopoietic stem cells (hematopoetické kmenové buňky)
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (transplantace hematopoetických kmenových buněk)
IFN- α	interferon alfa
IL	interleukin
IM	imatinib mesylát
IS	international score (mezinárodní skóre)
kb	kilobáze
KD	kostní dřev
KO	krevní obraz
MDS	myelodysplastický syndrom
M-FISH	multicolor FISH, mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace
MMR	major molecular remission (velká molekulární odpověď)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MYC	lidský homolog v-MYC genu, izolovaného z viru ptačí myelocytomatózy
OS	overall survival (celkové přežití)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PCYR	Partial cytogenetic remission (částečná cytogenetická remise)
PDGFR β	platelet derived growth factor receptor beta (receptor destičkového růstového faktoru β)
Ph	Philadelphia chromosom
Q-RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RB1	gen pro retinoblastom

RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptázy
STI571	signal transduction inhibitor
TK	tyrosinová kináza
TKB	transplantace krvetvorných buněk
TKI	inhibitor tyrosinové kinázy
TP 53	tumor protein 53 (tumor supresorový gen)
TR	Texas Red
v – ABL	myší onkogenní virus (Ab-MuLV, Abelson Murine Leukemia Virus)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

11 SEZNAM LITERATURY

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 2000, 4th edn. W.B. Saunders.
2. Abrahamsson AE, Geron I, Gotlib J, Dao K-HT, Barroga CF, Newton IG, Giles FJ, Durocher J, Creusot RS, Karimi M, Jones C, Zehnder JL, Keating A, Negrin RS, Weissman IL, Jamiesona CHM. Glycogen synthase kinase 3beta missplicing contributes to leukemia stem cell generation. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(10):3925-3929.
3. Abruzzese E, Gozzetti A, Galimberti S, Trawinska MM, Caravita T, Siniscalchi A, Cervetti G, Mauriello A, Coletta AM, De Fabritiis P. Characterization of Ph-negative abnormal clones emerging during imatinib therapy. Cancer 2007;109(12):2466-2472.
4. Babická L, Zemanová Z, Pavlišťová L, Březinová J, Ransdorfová Š, Housková L, Moravcová J, Klamová H, Michalová K. Complex chromosomal rearrangements in patients with chronic myeloid leukemia. Cancer Genet and Cytogenet 2006;168:22-29.
5. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol 2009;27(35):6041-6051.
6. Bacher U, Hochhaus A, Berger U, Hiddemann W, Hehlmann R, Haferlach T, Schoch C. Clonal aberration in Philadelphia chromosome negative hematopoiesis in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib or interferon alfa. Leukemia 2005;19(3):460-463.

7. Barbouti A, Johansson B, Höglund M, Mauritzson N, Strömbeck B, Nilsson PG, Tanke HJ, Hagemeijer A, Mitelman F, Fioretos T. Multicolor COBRA-FISH analysis of chronic myeloid leukemia reveals novel cryptic balanced translocations during disease progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;35(2):127-137.
8. Bennet JM, Katovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galon DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revise criteria for the classification of acute leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103(4):620-625.
9. Berger U, Maywald O, Pfirman M, Lahaye T, Hochhaus A, Reiter A, Hasford J, Heimpel H, Hossfeld DK, Kolb H-J, Löffler H, Pralle H, Queisser W, Hehlmann R. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. *Leukemia* 2005;19(6):984–989.
10. Bernstein R, Pinto MR, Wallace C, Penfold G, Mendelow B. The incidence, type, and subsequent evolution of 14 variant Ph1 translocations in 180 South African patients with Ph1-positive chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1984;12(3):225-38.
11. Bizzozero OJ, Johnson KG, Ciocco A, Kawasaki S, Toyoda S. Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-1964: II. *Ann Intern Med* 1967;66(3):522-530.
12. Blick M, Romero P, Talpaz M, Kurzrock R, Shtalrid M, Andersson B, Trujillo J, Beran M, Gutterman J. Molecular characteristics of chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;27:349-356.
13. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3(7):730-737.
14. Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 1998;92(9):3362-3367.

15. Bumm T, Muller C, Al-Ali HK, Krohn K, Shepherd P, Schmidt E, Leiblein S, Franke C, Hennig E, Friedrich T, Krahl R, Niederwieser D, Deininger MW. Emergence of clonal cytogenetic abnormalities in Ph- cells in some CML patients in cytogenetic remission to imatinib but restoration of polyclonal hematopoiesis in the majority. *Blood* 2003;101:1941-1949.
16. Castagnetti F, Testoni N, Luatti S, Marzocchi G, Mancini M, Kerim S, Giugliano E, Albano F, Cuneo A, Abruzzese E, Martino B, Palandri F, Amabile M, Iacobucci I, Alimena G, Pane F, Martinelli G, Saglio G, Baccarani M, Rosti G. Deletions of the derivative chromosome 9 do not influence the response and the outcome of chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with imatinib mesylate: GIMEMA CML Working Party analysis. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2748-54.
17. Clarkson BD, Strife A, Wisniewski D, Lambek C, Carpino N. New understanding of the pathogenesis of CML: a prototype of early neoplasia. *Leukemia* 1997;11(9):1404-1428.
18. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Verstovsek S, Rios MB, Shan J, Kantarjian HM. Staging of chronic myeloid leukemia in imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* 2006;106(6):1306-1315.
19. Cortes J, O'Brien S, Kantarjian H. Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response. *Blood* 2004;104(7):2204-2205.
20. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Beth Rios M, Shan J, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Wierda W, Kantarjian H. Effects of age on prognosis with imatinib mesylate therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2003;98(6):1105-1113.
21. Curtin NJ, Campbell PJ, Green AR.: The Philadelphia translocation and pre-existing myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2005;128:730-736.
22. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990;247(4944):824-830.

23. Deininger MW, Goldman JM. Chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 1998;5(4):302-308.
24. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, Szydlo R, Olavarria E, Kaeda J, Goldman JM, Marin D. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008;26(20):3358-63
25. Elefanty AG, Hariharan IK, Cory S. Bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J* 1990;9(4):1069-1078.
26. El-Zimaity MM, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Thomas D, Ferrajoli A, Hayes K, Nebiyou Bekele B, Zhou X, Rios MB, Glassman AB, Cortes JE. Results of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukaemia with variant Philadelphia chromosome. *Br J Haematol* 2004;125(2):187-195.
27. Faber E. Hemopoetické růstové faktory v praxi. *Interní medicína pro praxi* 2004;3:126-129.
28. Faber E, Indrák K. Chronická myeloidní leukémie. 2010, Praha, 1. vydání Galén.
29. Falchi L, Rege-Cambrin G, Fava C, Donti E, Luzi D, Giugliano E, Gubbiotti M, Schippa M, Liberati AM. Sustained molecular remissions are achievable with tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia and additional cytogenetic clonal evolution. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;199:139-142.
30. Feldman EJ, Najfeld V, Schuster MW, et al. Emergence of Philadelphia (Ph) negative, trisomy 8 positive cells in patients with chronic myelogenous leukemia (CML) treated inatinib mesylate: clinical evidence for a multistep pathogenesis. *Blood* 2002;100:585a(Abstract)

31. Fitzgerald PH, Morris CM. Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias. Serial translocations or a concerted genomic rearrangement? *Cancer Genet Cytogenet* 1991;57(2):143-151.
32. Fitzgerald PH, Morris CM. Ph-Negative Chronic Myeloid Leukemia: The Nature of the Breakpoint Junctions and Mechanism of ABL Transposition. *Leuk Lymphoma* 1992;6:277-287.
33. Fourouclas N, Campbell PJ, Bench AJ, Swanton S, Baxter EJ, Huntly BP, Green AR. Size matters: the prognostic implications of large and small deletions of the derivative 9 chromosome in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2006;91:952–955.
34. Gishizky ML, Witte ON. Initiation of deregulated growth of multipotent progenitor cells by bcr-abl in vitro. *Science* 1992;256(5058):836-839.
35. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349(15):1451–1464.
36. Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL in Chronic Myelogenous Leukemia – How Does It Work? *Acta Haematol* 2008;119:212–217.
37. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, Bartram C, de Klein A, Grosveld G. The human c-abl oncogene in the Philadelphia translocation. *J Cell Physiol Suppl* 1984;3:179-191.
38. Guilhot F, Apperley J, Kim DW, Bullorsky EO, Baccarani M, Roboz GJ, Amadori S, de Souza CA, Lipton JH, Hochhaus A, Heim D, Larson RA, Branford S, Muller MC, Agarwal P, Gollerkeri A, Talpaz M. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood* 2007;109(10):4143-4150.
39. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Miller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee

- meeting-Airlie House Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17(12):3835-3849.
40. Harrison CJ, Gibbons B, Yang F, Butler T, Cheung KL, Kearney L, Dirscherl L, Bray-Ward P, Gregson M, Ferguson-Smith M. Multiplex fluorescence in situ hybridization and cross species color banding of a case of chronic myeloid leukemia in blastic crisis with a complex Philadelphia translocation. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;116(2):105-10.
 41. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(11):850-858.
 42. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukemia. *Lancet* 2007;370(9584):342-350.
 43. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983; 306(5940):239-242.
 44. Herens C, Tassin F, Lemaire V, Beguin Y, Collard E, Lampertz S, Croisiau C, Lecomte M, De Prijk B, Longree L, Koulischer L. Deletion of the 5'-ABL region: a recurrent anomaly detected by fluorescence in situ hybridization in about 10% of Philadelphia positive chronic myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol* 2000;110(1):214-216.
 45. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, Corm S, Shah NP, Cervantes F, Silver RT, Niederwieser D, Stone RM, Dombret H, Larson RA, Roy L, Hughes T, Müller MC, Ezzeddine R, Countouriotis AM, Kantarjian HM. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008;22(6):1200-6.

46. Huntly BJ, Reid AG, Bench AJ, Campbell LJ, Telford N, Shepherd P, Szer J, Prince HM, Turner P, Grace C, Nacheva EP, Green AR. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001;98(6):1732-1738.
47. Huntly BJ, Bench A, Green AR. Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2003;102(4):1160-1168.
48. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–159.
49. Ishizawa R, Parsons SJ: c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 2004;6(3):209-214.
50. Jabbour E, Kantarjian HM, Abruzzo LV, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Shan J, Rios MB, Cortes J. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 2007;110(8):2991-5.
51. Jarošová M, Pospíšilová H, Plachý R, Divoká M, Holzerová M, Papajík T, Koptíková J, Indrák K. Principy a význam použití arrayCGH v hematologii. *Čas Lék Česk* 2006;145(1):9-13.
52. Jarosova M. Comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia. *Methods Mol Med* 2004;97:145-157.
53. Jarosova M, Holzerova M, Mihal V, Lakoma I, Divoky V, Blazek B, Pospisilova D, Hajduch M, Novak Z, Dusek L, Koptikova J, Poulsen TS, Indrak K. Complex karyotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: cytogenetic and molecular cytogenetic study of 21 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;145(2):161-168.

54. Jarošová M, Jedličková K, Holzerová M, Urbanová R, Papajík T, Raida L, Pikalová Z, Lakomá I, Prekopová I, Kropáčková J, Indrák K. Contribution of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization to the detection of chromosomal abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Onkologie* 2001;24(1):60-65.
55. Jennings BH, Mills KI. C-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 1998;22:849-903.
56. Johanson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002;107:76-94.
57. Jorgensen HG, Holyoake TL. Charakterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. *Biochem Soc Trans* 2007;35(5):1347-51.
58. Kantarjian H, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. *TheLeukemia Service. Ann Intern Med* 1995;122:254-261.
59. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Rios MB, Shan J, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Verstovsek S, Wierda W, Keating M, Talpaz M. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. *Cancer* 2003;98(12):2636-2642.
60. Ketley NJ, Newland AC. Haemopoietic growth factors. *Postgrad Med J* 1997;73(858):215-221.
61. Kim DH, Popradi G, Sriharsha L, Kamel-Reid S, Chang H, Messner HA, Lipton JH. No significance of derivative chromosome 9 deletion on the clearance kinetics of BCR/ABL fusion transcripts, cytogenetic or molecular response, loss of response, or treatment failure to imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2008;113(4):772-781.
62. Kim M, Lee S, Jung CK, Lim J, Cho SG, Kim DW, Kim H, Han K, Min WS, Kim CC. Transient trisomy 8 abnormality in Philadelphia-negative cells during imatinib

- mesylate treatment of chronic myelogenous leukemia. *Int J Lab Hematol* 2008;30(6):508-512.
63. Knijnenburg J, Szuhai K, Giltay J, Molenaar L, Sloos W, Poot M, Tanke HJ, Rosenberg C. Insights from genomic microarrays into structural chromosome rearrangements. *Am J Med Genet* 2005;132:36-40.
 64. Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton S, Squire JA. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 2001;97(11):3581-3588.
 65. Koury MJ, Lichtman MA. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT, eds. *Williams Hematology* (8th ed). New York, The McGraw-Hill Companies Inc; 2010:41-74.
 66. Kramer A, Reiter A, Kruth J, Erben P, Hochhaus A, Muller M, Cross NC, Jones AV, Ho AD, Hensel M. V617F JAK2 mutation in a patient with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Lancet Oncol.* 2007, 7:658-660.
 67. Li J-Y, Xu W, Wu W, Zhu Y, Qiu H-R, Zhang R, Zhang S-J, Qian S-X. The Negative Prognostic Impact of Derivative 9 Deletions in Patients Who Received Hydroxyurea Treatment for Chronic Myelogenous Leukemia in the Chronic Phase. *Onkologie* 2008;31(11):585-589.
 68. Lin Y., Bruyere H., Horsman DE, Pantzar T, Barnett MJ, Hogge DE, Nevill TJ, Nantel SH, Sutherland HJ, Toze CL, Shepherd JD, Lavoie JC, Song KW, Smith CA, Forrest DL. Philadelphia-negative clonal hematopoiesis following imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: a report of nine cases and analysis of predictive factors. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 170:16-23.
 69. Lippert E, Etienne G, Mozziconacci M-J, Laibe S, Gervais C, Girault S, Gachard N, Tigaud I, Dastugue N, Huguet F, Fort M-P, Legros L, Eclache V, Mahon F-X. Loss of the Y chromosome in Philadelphia-positive cells predicts a poor response

of chronic myeloid leukemia patients to imatinib mesylate therapy. *Haematologica* 2010;95:1604-1609.

70. Lisker R, Casas L, Mutchinick O, Pérez-Chávez F, Labardini J. Late-appearing Philadelphia chromosome in two patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1980;56(5):812-814.
71. Loriaux M, Deininger M. Clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome negative cells in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leuk Lymphoma* 2004;45(11):2197-2203.
72. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990; 2;247(4946):1079-82.
73. Moloney WC. Radiogenic leukemia revisited. *Blood* 1987;70(4):905-8.
74. Mayer J, Starý J. *Leukemie*. 2002, Praha, 1. vydání Grada.
75. McWhirter JR, Wang JY. Effect of Bcr sequences on the cellular function of the Bcr-Abl oncoprotein. *Oncogene* 1997;15(14):1625-1634.
76. Medina, J., Kantarjian, H., Talpaz, M., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Giles, F., Rios, M.B., Hayes, K. & Cortes, J. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome-negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer* 2003;98:1905–1911.
77. Minami Y, Stuart SA, Ikawa T, Jiang Y, Banno A, Hunton IC, Young DJ, Naoe T, Murre C, Jamieson CH, Wang JY. BCR/ABL transformed GMP as myeloid leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(46):17967-17972.
78. Mitelman F, Johansson B, Mertens F, editors. *Mitelman database of chromosome aberrations in cancer* [Internet]. Updated 2002. Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. Accessed May 2005.

79. Mohamed AN, Pemberton P, Zondej J, Schiffer CA. The effects on imatinib mesylate on patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia with secondary chromosomal aberrations. *Clin Cancer Res* 2003;9:1333-7.
80. Mughal TI, Goldman JM. Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: beyond the imatinib era. *Front Biosci* 2006;11:209-220.
81. Naušová J, Priwitzerová M, Jarošová M, Indrák K, Faber E, Divoký V. Chronická myeloidní leukémie - rezistence na imatinib mesylát (Glivec) - přehled literatury a vlastní zkušenosti. *Čas Lék Čes* 2006;145(5):377-382.
82. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.
83. O'Brien S, Thall PF, Siciliano MJ. Cytogenetic of chronic myelogenous leukemia. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10:259-276.
84. O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, Radich JP, Rudoltz M, Filian J, Gathmann I, Druker BJ, Larson RA. International randomized study of interferon versus STI571 (IRIS) 7-year follow-up: Sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib (IM). *Blood* 2008; 112: Abstr. NO 186.
85. O'Dwyer ME, Druker BJ. Chronic myelogenous leukaemia - new therapeutic principles. *J Int Med* 2001;250(1):3-9.
86. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, Mori M, Balleisen S, Olson S, Magenis E, Capdeville R, Druker BJ. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood* 2002;100(5):1628-33
87. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Blasdel C, Farnsworth M, Kurilik G, Hsieh YC, Mori M, Druker BJ. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate. *Blood* 2004;103(2):451-5

88. O'Shea D, Crotty G, Carroll P, Conneally E, McCann S, Neat MJ. Clonal karyotypic abnormalities in Philadelphia negative cells of CML patients treated with imatinib: is it under-reported and does it have any clinical significance. *Br J Haematol* 2004; 127: 367-369.
89. Otero L, Ornellas MH, de Azevedo AM, Dobbin J, Abdelhay E, Bouzas LF, Fernandez T. The impact of additional chromosomal abnormalities in response to imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53:405-410
90. Pabst T, Stillner E, Neuberg D, Nimer S, Willman CL, List AF, Melo JV, Tenen DG, Mueller BU. Mutations of the myeloid transcription factor CEBPA are not associated with the blast crisis of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006;133(4):400-402.
91. Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, Hehlmann R. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124(12):643-660.
92. Pavlovsky C, Kantarjian H, Cortes JE. First-line therapy for chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. *Am J Hematol* 2009;84(5):287-93
93. Perrotti D, Cesi V, Trotta R, Guerzoni C, Santilli G, Campbell K, Iervolino A, Condorelli F, Gambacorti-Passerini C, Caligiuri MA, Calabretta B. BCR/ABL supresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 2002; 30:48-58.
94. Popenoe DW, Schaefer-Rego K, Mears JG, Bank A, Leibowitz D. Frequent and extensive deletion during the 9,22 translocation in CML. *Blood* 1986;68(5):1123-1128.
95. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Rios MB, Hayes K, Glassman A, Bekele BN, Zhou X, Cortes J. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2005;105(6):2281-2286.

96. Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, Sawyers C, Shah N, Stock W, Willman CL, Friend S, Linsley PS. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(8):2794-2799.
97. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-293.
98. Roy L, Guilhot J, Krahnke T, Guerci-Bresler A, Druker BJ, Larson RA, O'Brien S, So C, Massimini G, Guilhot F. Survival advantage from imatinib interferon-alpha plus cytarabine in compared with the combination chronic-phase chronic myelogenous leukemia: historical comparison between two phase 3 trials. *Blood* 2006;108(5):1478-84.
99. Royer-Pokora B, Hildebrandt B, Redmann A, Herold C, Kronenwett R, Haas R et al. Simultaneous occurrence of a t(9;22) (Ph) with a t(2;11) in a patient with CML and emergence of a new clone with the t(2;11) alone after imatinib mesylate treatment. *Leukemia* 2003;17:807-810.
100. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994;77(1):121-31
101. Shaffer LG, Tommerup N, (eds). *ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature*. 2005 Basel, Karger.
102. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds). *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009)*. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, 2009, Karger.
103. Schoch C, Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Hochhaus A. Occurrence of additional chromosome aberrations in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 2003;17(2):461-3.

104. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002;2(2):117-125.
105. Sinclair PB, Green AR, Grace C, Nacheva EP. Improved sensitivity of BCR-ABL detection: a triple-probe three-color fluorescence in situ hybridization system. *Blood* 1997;90:1395-1402.
106. Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;95(3):738-743.
107. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, Zon G, Iozzo RV, Calabretta B. Antisense oligodeoxynucleotide combination therapy of primary chronic myelogenous leukemia blast crisis in SCID mice. *Blood* 1996;88:1005-1012.
108. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984;63(4):789-799.
109. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985;315(6020):550-4.
110. Stopera SA, Ray M, Riordan D, Christie N, Wickstrom D. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: correlation with cancer breakpoints, fragile sites and oncogenes. *Cancer Lett* 1990; 55(3):249-53.
111. Stuart SA, Minami Y, Wang JY. The CML stem cell: evolution of the progenitor. *Cell Cycle* 2009;8(9):1338-1343.
112. Su XY; Wong N, Cao Q, Yu LZ, Niu C, Wickham N, Johnson PJ, Chen Z, Chen SJ. Chromosomal Aberrations During Progression of Chronic Myeloid Leukemia Identified by Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Tools: Implication of 1q12-21. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;108(1),6-12.

113. Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R, Gutterman JU. Interferon alpha in the therapy of CML. *Br J Haematol* 1991;79 Suppl 1:38-41.
114. Tavian M, Péault B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol* 2005;49(2-3):243-250.
115. Terre C, Eclache V, Rousselot P, Imbert M, Charrin C, Gervais C, Mozziconacci MJ, Maarek O, Mossafa H, Auger N, Dastugue N, Talmant P, Van den Akker J, Leonard C, N'Guyen Khac F, Mugneret F, Viguié F, Lafage-Pochitaloff M, Bastie JN, Roux GL, Nicolini F, Maloisel F, Vey N, Laurent G, Recher C, Vigier M, Yacouben Y, Giraudier S, Vernant JP, Salles B, Roussi J, Castaigne S, Leymarie V, Flandrin G, Lessard M. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2004;18:1340-1346.
116. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956;42:1-6.
117. Toman M. *Veterinární imunologie*. 2000, Praha, 1. vydání Grada Publishing.
118. Tomasson MH, Sternberg DW, Williams IR, Carroll M, Cain D, Aster JC et al. Fatal myeloproliferation, induced in mice by TEL/PDGFBetaR expression, depends on PDGFBetaR tyrosines 579/581. *J Clin Invest* 2000;105(4):423-32.
119. Valencia A, Cervera J, Such E, Barragán E, Bolufer P, Fuster O, Collado R, Martínez J, Sanz MA. Complex Variant t(9;22) Chromosome Translocations in Five Cases of Chronic Myeloid Leukemia. *Adv Hematol* 2009;2009:187125.
120. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901-1928.

121. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-951.
122. Verma D, Kantarjian H, Shan J, O'Brien S, Estrov Z, Garcia-Manero G, Koller C, Borthakur G, Cortes J. Survival outcomes for clonal evolution in chronic myeloid leukemia patients on second generation tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer* 2010;116(11):2673-81
123. Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, Yuan B, Lemon WJ, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de La Chapelle A, Krahe R. Expression profiling reveals fundamental biologic differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1124-1129.
124. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.
125. Yong AS, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF, Melo JV. Molecular profiling of CD34+ cells identifies low expression of CD7, along with high expression of proteinase 3 or elastase, as predictors of longer survival in patients with CML. *Blood* 2006;107(1):205-212

12 SEZNAM PUBLIKACÍ

I. Publikace související s disertační prací

Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Faber E, Nausová J, Jarosová M, Egorin MJ, Holzerová M, Rozmanová S, Maresová I, Divoký V, Indrác K. Intermittent dosage of imatinib mesylate in CML patients with a history of significant hematologic toxicity after standard dosing. *Leuk Lymphoma* 2006 Jun;47(6):1082-90. **IF 1,559**

Holzerová M, Faber E, Veselovská J, Urbánková H, Balcárková J, Rozmanová S, Voglová J, Muzík J, Chroust K, Indrác K, Jarošová M. CAMELIA-Chronic Myeloid Leukaemia Project.: Imatinib mesylate efficacy in 72 previously treated Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia patients with and without additional chromosomal changes: single-center results. *Cancer Genet Cytogenet* 2009 May;191(1):1-9. **IF 1,537**

Přednášky

Holzerová M, Jarošová M, Pospíšilová H, Faber E, Lakomá I, Prekopová I, Hanzlíková J, Chludová K, Papajík T, Indrác K. Interfázni FISH u nemocných s CML léčených preparátem Glivec. V. Hradecký den cytogenetiky a molekulární genetiky, Hradec Králové, 14. 4. 2004

Holzerová M, Jarošová M, Pospíšilová H, Priwitzerová M, Divoký V, Lakomá I, Prekopová I, Hanzlíková J, Divoká M, Vogelová J, Faber E, Indrác K. Přídavné chromosomové změny u pacientů s CML léčených preparátem Glivec. XVIII. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, 2. – 5. 6. 2004

Holzerová M, Jarošová M, Pospíšilová H, Chludová K, Lakomá I, Prekopová I, Hanzlíková J, Faber E, Indrác K. Cytogenetika a molekulární cytogenetika nemocných

s CML léčených preparátem Glivec. 37. Výroční cytogenetická konference s mezinárodní účastí, Olomouc, 9. – 10. 9. 2004

Holzerová M, Faber E, Pospíšilová H, Strašilová J, Voglova J, Divoky V, Naušová J, Indrák K, Jarošová M. Přídavné chromosomové změny u pacientů s CML léčených preparátem Glivec. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. Olomouc, 9. – 10. 12. 2005

Postery

Holzerová M, Jarošová M, Faber E, Pospíšilová H, Priwitzerová M, Lakomá I, Naušová J, Divoký V, Divoká M, Vogelová J, Indrák K. Additional chromosomal abnormalities in CML patients treated with Glivec (cytogenetic and molecular cytogenetic study of 72 cases). 9th Congress of the European Hematology Association, Ženeva, Švýcarsko, 10. – 13. 6. 2004

Holzerova M, Faber E, Pospisilova H, Lakoma I, Divoky V, Nausova J, Divoka M, Voglova J, Indrak K, Jarosova M. Cytogenetic and molecular cytogenetic study of 72 CML patients treated with imatinib. Konference Evropské společnosti pro lidskou genetiku, Praha, 7. – 10. 5. 2005

II. Ostatní publikace

Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Jarošová M, Holzerova M, Mihál V, Blatný J, Lakomá I, Trka J, Pikalová Z, Hrusák O, Indrák K. Additional evidence of genetic changes in children with ALL and TEL/AML1 fusion gene. Leukemia 2002 Sep;16(9):1873-5. **IF 4,693**

Jarošová M, Holzerová M, Mihál V, Lakomá I, Divoký V, Blazek B, Pospíšilová D, Hajdúch M, Novák Z, Dusek L, Koptíková J, Poulsen TS, Indrák K. Complex karyotypes

in childhood acute lymphoblastic leukemia: cytogenetic and molecular cytogenetic study of 21 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2003 Sep;145(2):161-8. **IF 1,542**

Jarosová M, Papajík T, Holzerová M, Dusek L, Pikalová Z, Lakomá I, Raida L, Faber E, Divoká M, Vlachová S, Prekopová I, Novosadová A, Pospíšilová H, Indrák K. High incidence of unbalanced chromosomal changes in mantle cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leuk Lymphoma* 2004 Sep;45(9):1835-46. **IF 1,147**

Jarosova M, Takacova S, Holzerova M, Priwitzerova M, Divoka M, Lakoma I, Mihal V, Indrak K, Divoky V. Cryptic MLL-AF10 fusion caused by insertion of duplicated 5' part of MLL into 10p12 in acute leukemia: a case report. *Cancer Genet Cytogenet* 2005 Oct 15;162(2):179-82. **IF 1,640**

Bedrnicek J, Vicha A, Jarosova M, Holzerova M, Cinatl Jr J, Michaelis M, Cinatl J, Eckschlager T. Characterization of drug-resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization. *Neoplasma* 2005;52(5):415-9. **IF 0,731**

Balcárková J, Urbánková H, Scudla V, Holzerová M, Bacovský J, Indrák K, Jarosová M. Gain of chromosome arm 1q in patients in relapse and progression of multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 2009 Jul 15;192(2):68-72. **IF 1,537**

Jarosova M, Urbankova H, Plachy R, Papajik T, Holzerova M, Balcarkova J, Pikalova Z, Divoky V, Indrak K. Gain of chromosome 2p in chronic lymphocytic leukemia : significant heterogeneity and a new recurrent dicentric rearrangement, *Leukemia and Lymphoma*, 2010;51 (2): 304-313. **IF 2,397**

Urbánková H, Holzerová M, Balcárková J, Raida L, Procházka V, Pikalová Z, Papajík T, Indrák K, Jarosová M. Array comparative genomic hybridization in the detection of chromosomal abnormalities in T-cell prolymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Oct 1;202(1):58-62. **IF 1,537**

Původní vědecké publikace uveřejněné v recenzovaných vědeckých časopisech

Jarošová M, Pospíšilová H, Plachý R, Divoká M, Holzerová M, Papajík T, Koptíková J, Indrák K. Principy a význam použití array CGH v hematologii. Čas Lék Česk. 2006;145(1):9-13. Review.

Balcárková J, Procházková K, Ščudla V, Holzerová M, Bačovský J, Zemanová M, Pospíšilová H, Hanzlíková J, Kropáčková J, Prekopová I, Pika T, Minařík J, Indrák K, Jarošová M Molekulárně cytogenetická analýza plazmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem. Transfuze a hematologie dnes 2007; 4: 176 -182.

Zemanová Z, Michalová K, Tajtlová J, Pavlišťová L, Oltová A, Filková H, Kuglík P, Němec P, Holzerová M, Balcárková J, Jarošová M, Rabasová J, Hrubá M, Fischlová H, Špička I, Gregora E, Adam Z, Ščudla V, Maisnar V, Schulzová M, Králová D, Hájek R: Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy imunofluorescenčně značených plasmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem zařazených ve studii CMG 2002. Klinická Onkologie 2008 supplement I/2008, 204-206.

Szotkowski T, Jarosova M, Faber E, Hubacek J, Hlusi A, Papajik T, Pikalova Z, Kucerova L, Holzerova M, Budikova M, Buriankova E, Plachy R, Potomkova J, Klusova N, Szotkowska R, Indrak K. Precursor T-lymphoblastic lymphoma as a secondary malignancy in a young patient after successful treatment of acute promyelocytic leukemia. Onkologie. 2009 Sep;32(8-9):513-5. Epub 2009 Jul 23

Přednášky

Holzerová M, Jarošová M, Pospíšilová H, Mihál V, Blažek B, Štěrba J, Lakomá I, Prekopová I, Hanzlíková J, Pikalová Z, Zemanová Z, Indrák K. Detekce nebalancovaných chromozomových změn u dětských ALL metodou CGH. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky a 36. výroční zasedání cytogenetické sekce Biologické společnosti ČAV, Plzeň, 17. – 19. 9. 2003

Holzerová M, Chludová K, Ščudla V, Vytřasová M, Pospíšilová H, Lakomá I, Prekopová I, Hanzlíková J, Kropáčková J, Indrák K, Jarošová M. Studie chromosomových změn u

nemocných s mnohočetným myelomem. XIX. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, 15. – 18. 6. 2005

Holzerová M, Chludová K, Ščudla V, Vytřasová M, Pospíšilová H, Lakomá I, Prekopová I, Hanzlíková J, Kropáčková J, Indrák K, Jarošová M. Studie chromosomových změn u nemocných s mnohočetným myelomem. 38. Výroční konference cytogenetické sekce Čs. Biologické společnosti, Brno, 8. – 9. 9. 2005

Holzerová M, Pospíšilová H, Papajík T, Urbanová R, Pikalová Z, Plachý R, Dušek L, Budínská E, Sulovská I, Indrák K, Jarošová M. Cytogenetic and FISH study in 203 B-CLL patients. XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc, 31. 5. – 3. 6. 2006

Holzerová M, Lakomá I, Pospíšilová H, Prekopová I, Kropáčková J, Hanzlíková J, Pospíšilová D, Novák Z, Mihál V, Blažek B, Kuhn T, Ptoczková H, Indrák K, Jarošová M. Vysoká frekvence a heterogenita přídatných chromosomových změn u dětských TEL/AML1 pozitivních ALL. Výsledky olomouckého cytogenetického centra z období let 1996-2006. 39. výroční konference Cytogenetické sekce Čs. Biologické společnosti, České Budějovice, 14. – 15. 9. 2006

Holzerová M, Lakomá I, Pospíšilová H, Prekopová I, Kropáčková J, Hanzlíková J, Pospíšilová D, Novák Z, Mihál V, Blažek B, Kuhn T, Ptoczková H, Indrák K, Jarošová M. Dicentrické chromosomy u dětských akutních lymfoblastických leukemií (ALL). II. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc, 7. -9. 12. 2006

Holzerová M, Lakomá I, Pospíšilová H, Balcárková J, Pospíšilová D, Novák Z, Mihál V, Blažek B, Indrák K, Jarošová M. Dicentric chromosomes in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). XXI. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, 16. – 19. 6. 2007

Holzerová M, Pospíšilová H, Balcárková J, Hubáček J, Szotkowski T, Indrák K, Jarošová M. Mapování chromosomového zlomu zahrnutého do nové translokace t(11;18) u AML. Celostátní sjezd společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 40. výroční cytogenetická konference, Praha, 19. -21. 9. 2007

Holzerová M, Urbánková H, Balcárková J, Papajík T, Indrák K, Jarošová M. Duplikace 12q u lymfoproliferací. VII. Hradecký den cytogenetiky a molekulární genetiky, Hradec Králové, 16.4.2008

Holzerová M, Urbánková H, Plachý R, Kučerová L, Pikalová Z, Papajík T, Indrák K, Jarošová M. Zmnožení oblasti 2p u nemocných s CLL. 41. výroční cytogenetická konference. Olomouc, 11.–12. září 2008

Holzerová M, Urbánková H, Balcárková J, Papajík P, Indrák K, Jarošová M. Jak může cytogenetické vyšetření uzliny přispět k diagnostice lymfomů. 5. Moravské lymfomové symposium, Olomouc, 23.1.2009

Postery:

Holzerová M, Jarošová M, Mihál V, Blažek B, Lakomá I, Pospíšilová H, Prekopová I, Hanzlíková J, Divoká M, Pikalová Z, Indrák K. High incidence of additional chromosomal changes in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL/AML1 gene fusion. Eur J Human Genetics 2003;11; Suppl.1; p.87. European human genetics conference 2003, England, Birmingham, 3. – 6. 5. 2003

Holzerová M, Jarošová M, Mihál V, Pospíšilová H, Blažek B, Starý J, Zuna J, Trka J, Pospíšilová D, Divoká M, Zemanová Z, Hrušák O, Divoký V, Pikalová Z, Indrák K. Comparative genomic hybridization /CGH) in detection of chromosomal changes in 120 childhood acute lymphoblastic leukemias. Update of results. Annales de Génétique; 2003

Holzerová M, Jarošová M, Mihál V, Blažek B, Lakomá I, Pospíšilová H, Prekopová I, Hanzlíková J, Divoká M, Pikalová Z, Indrák K. Vysoká incidence přídavných chromosomových změn u dětských TEL/AML1 pozitivních ALL. XVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí Olomouc, 4. – 7. 6. 2003

Holzerová M, Mihál V, Lakomá I, Prekopová I, Hanzlíková J, Pospíšilová H, Novák Z, Pospíšilová D, Blažek B, Indrák K, Jarošová M. Chromosome Research, Vol. 13, Supplement 1, 2005 Aberrations of Chromosome 7 in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemias. 5th European Cytogenetics Conference Španělsko, Madrid, 4. – 7. 6. 2005

Holzerova M, Pospisilova H, Papajik T, Urbanova R, Pikalova Z, Plachy R, Indrak K, Jarosova M. Cytogenetic and FISH study in 203 B-CLL patients. Haematologica, The hematology journal, Abstract book, Vol. 91 – Supplement No 1, June, 2006. 11th Congress of the European Hematology Association (EHA), Amsterdam, the Netherlands, June 15 – 18, 2006

Holzerova M, Lakoma I, Pospisilova H, Balcarkova J, Pospisilova D, Novak Z, Mihal V, Blazek B, Indrak K, Jarosová M. Dicentric chromosomes in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). 6th European Cytogenetic Conference, 7-10 July 2007, Istanbul, Turkey

Holzerová M, Urbánková H, Balcárková J, Plachý R, Kučerová L, Pikalová Z, Papajík T, Indrák K, Jarošová M. Gains of chromosome 2p in chronic lymphocytic leukemia. XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc, 28. – 31. 5. 2008

Holzerová M, Urbánková H, Balcárková J, Plachý R, Kučerová L, Pikalová Z, Papajík T, Indrák K, Jarošová M. Gains of chromosome 2p in chronic lymphocytic leukemia. ESHG Conference 2008, Barcelona, Španělsko, 31.6. – 3.7.2008