

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2013**

**Bc. Lenka Krůzová**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Cytogenetika a molekulární cytogenetika  
v detekci chromozómových změn u nemocných  
s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)**

Diplomová práce

**Bc. Lenka Krůzová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

**Olomouc 2013**

Vedoucí práce: **RNDr. Milena Holzerová, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma “Cytogenetika a molekulární cytogenetika v detekci chromozomových změn u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)” vypracovala samostatně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Bc. Lenka Krůzová

## Souhrn

Předkládaná diplomová práce s názvem “Cytogenetika a molekulární cytogenetika v detekci chromozómových změn u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)” je zaměřena na význam konvenční a molekulární cytogenetiky jako prognostických faktorů u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií vyšetřených na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Celkový soubor tvoří celkem 94 pacientů vyšetřených metodou FISH panelem sond pro B-CLL (sondy ke zjištění delece 13q14, trizomie 12, přestavby IgH, delece 6q21, duplikace 8q24, delece TP53 a ATM. 80 pacientů mělo diagnostikovanou B-CLL a 14 pacientů bylo následně uzavřeno jako jiná diagnóza - nejčastěji nonhodgkinovy lymfomy.

Z celkového souboru pacientů bylo potvrzeno 28 pacientů s monoalelickou delecí 13q14 (36 %), 16 pacientů s delecí ATM (21 %), 10 pacientů s fyziologickou delecí IgH (16 %), 7 pacientů s duplikací MYC (13 %), 7 pacientů s delecí TP53 (9 %), 5 pacientů s monoalelickou i bialelickou delecí 13q14 (6 %), 4 pacienti s přestavbou IgH (6,5 %), 4 pacienti s delecí 6q21 (6,5 %), 1 pacient (1,7 %) s parciální delecí MYC (3' konce genu), 1 pacient s bialelickou delecí 13q14 (1 %). Z celkových 8 vyšetřených pacientů na zmnožení 2p bylo 2p+ prokázáno u 4 pacientů.

Byl tedy potvrzen význam cytogenetického i molekulárně-cytogenetického vyšetření v roli určování prognóz u pacientů s B-CLL.

## Summary

This diploma thesis entitled "Cytogenetics and molecular cytogenetics in the detection of chromosomal abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL)" is focused on the importance of conventional and molecular cytogenetics as prognostic factors in patients with chronic lymphocytic leukemia tested on Hemato-Oncology, University Hospital and Medical Faculty of Palacky University in Olomouc.

The group consists of 94 patients examined by FISH with probes for B-CLL (probes to detect 13q14 deletion, trisomy 12, translocation of IgH, deletion of 6q21, duplication of 8q24, deletions of TP53 and ATM. 80 patients were diagnosed with B-CLL and 14 patients were subsequently closed as other diagnosis - most nonhodgkin lymphomas.

From the group of patients was confirmed by 28 patients with monoallelic deletion of 13q14 (36 %), 16 patients with deletion of ATM (21 %), 10 patients with physiological deletion of IgH (16 %), 7 patients with duplication of MYC (13 %), 7 patients with deletion of TP53 (9 %), 5 patients with monoallelic and biallelic deletion of 13q14 (6 %), 4 patients with translocation of IgH (6,5 %), 4 patients with deletion of 6q21 (6,5 %), 1 patient (1,7 %) with partial deletion of MYC (3'-gene), 1 patient with biallelic deletion of 13q14 (1 %). Out of 8 patients examined on the multiplication 2p, was 2p+ demonstrated in 4 patients.

It was confirmed the importance of cytogenetic and molecular cytogenetic investigations in the role of determining the prognosis of patients with B-CLL.

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala RNDr. Mileně Holzerové, Ph.D. za odborné rady, vedení, trpělivost a také za příjemnou spolupráci. Dále prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc. a kolegyním Mgr. Pavle Mičkové, Mgr. Silvii Reptové, Mgr. Radce Nedomové, Janě Hanzlíkové, Jitce Kropáčkové a Ivě Prekopové za pomoc a trpělivost. Dále velké díky patří Mgr. Kateřině Langové, Ph.D. z Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za pomoc při zpracování statistické analýzy.

V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině za psychickou i finanční podporu po dobu mého studia.

Diplomová byla vypracována za finanční podpory grantu IGA MZČR č. NT13576.

## Obsah

1	Cíle práce.....	9
2	Úvod .....	10
3	Současný stav řešené problematiky .....	11
3.1	Hematopoéza .....	11
3.2	Chronická B-lymfocytární leukémie (B-CLL) .....	15
3.2.1	Obecná charakteristika onemocnění.....	15
3.2.2	Klinické stážování .....	16
3.2.3	Léčba .....	17
3.2.4	Minimální reziduální nemoc (MRD – minimal residual disease) .....	18
3.2.5	Prognostické faktory CLL .....	18
3.2.5.1	Klasické prognostické faktory .....	18
3.2.5.2	Molekulární prognostické faktory .....	19
3.2.1.3	Další prognostické faktory.....	21
3.2.1.4	Cytogenetické a molekulárně-cytogenetické prognostické faktory.....	21
3.3	Cytogenetika .....	28
3.4	Molekulární cytogenetika .....	29
3.4.1	FISH .....	29
3.4.2	M-FISH (multicolor FISH - mnohobarevná FISH).....	32
4	Materiál a metody.....	33
4.1	Biologický materiál .....	33
4.1.1	Kultivace biologického materiálu.....	33
4.1.2	Zpracování biologického materiálu .....	36
4.2	Konvenční cytogenetika .....	36
4.3	Molekulární cytogenetika .....	37
4.3.1	FISH (fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace).....	37
4.3.2	M-FISH (multicolor FISH).....	39
4.4	Použité přístroje.....	40
4.5	Použitý spotřební materiál .....	41
4.6	Použité chemikálie.....	41
4.7	Použité roztoky .....	42
5	Výsledky.....	45
5.1	Soubor nemocných .....	45

5.2	Výsledky cytogenetické analýzy .....	50
5.2.1.	Nemocní vyšetření v době diagnózy onemocnění.....	50
5.3	Výsledky FISH .....	55
5.4	Pacienti s jinou diagnózou.....	73
5.5	Kazuistiky.....	75
5.6	Statistická analýza .....	82
6	Diskuze .....	86
7	Závěr.....	90
8	Seznam použitých zkratk .....	91
9	Seznam použité literatury .....	93



## 1 Cíle práce

1. Stanovit genetické změny u souboru nemocných s B-CLL.
2. Shromáždit přehled literárních údajů - prognosticky významné chromozómové změny u B-CLL.
3. Detekovat genetické změny u nemocných s B-CLL pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace).
4. Vyhodnotit detekované chromozómové změny, statistická analýza.

## 2 Úvod

Chronická lymfocytární leukémie je nejčastějším typem hematologické malignity v západních zemích. Je charakterizována klonální proliferací a akumulací neoplastických B-lymfocytů s charakteristickým imunofenotypem v krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a slezině. Medián věku pacientů v době diagnózy je 65 let. Pouze 10 - 15 % pacientů je mladších 50-ti let. U stejných ročníků mužů a žen, postihuje tento typ leukémie dvakrát více muže než ženy. Průběh onemocnění se velmi různí, někteří pacienti přežívají dlouhá léta bez symptomů, jiní však umírají do pěti let od stanovení diagnózy (Rozman C. *et* Montserrat E., 1995).

Z tohoto důvodu je nutné rozeznat prognostické faktory, které určují průběh onemocnění. Jedná se o imunofenotypizaci (zejména pozitivita znaků CD38 a ZAP-70), mutační status IgVH a cytogenetické změny (delece 13q14, TP53, ATM, 6q21, duplikace 8q24, trizomie 12, přestavba IgH, zmnožení 2p).

### 3 Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Hematopoéza

Krvetvorba je kontinuální regulovaný proces produkce krevních buněk, který zahrnuje obnovu, proliferaci, diferenciaci a zrání. Výsledkem těchto procesů je formace, vývoj a specializace všech funkčních krevních buněk, které jsou uvolňovány z kostní dřeně do oběhu (Rodak *et al.*, 2007).

Všechny krevní buňky mají svého předka v hematopoetické kmenové buňce (HSC). Z té se liniově specifikují jednotlivé krevní řady, a ztrácejí tak schopnost sebeobnovy. Tato kmenová buňka se diferencuje na dva progenitory – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidního progenitoru vznikají erytrocyty, trombocyty, granulocyty a monocyty a z lymfoidního progenitoru se další diferenciací rozlišují B- a T- lymfocyty a NK-buňky. Každá z těchto buněk se vyznačuje specifickými povrchovými markery, což umožňuje jejich čištění, identifikaci a charakterizaci průtokovou cytometrií (Akashi *et al.*, 2000).

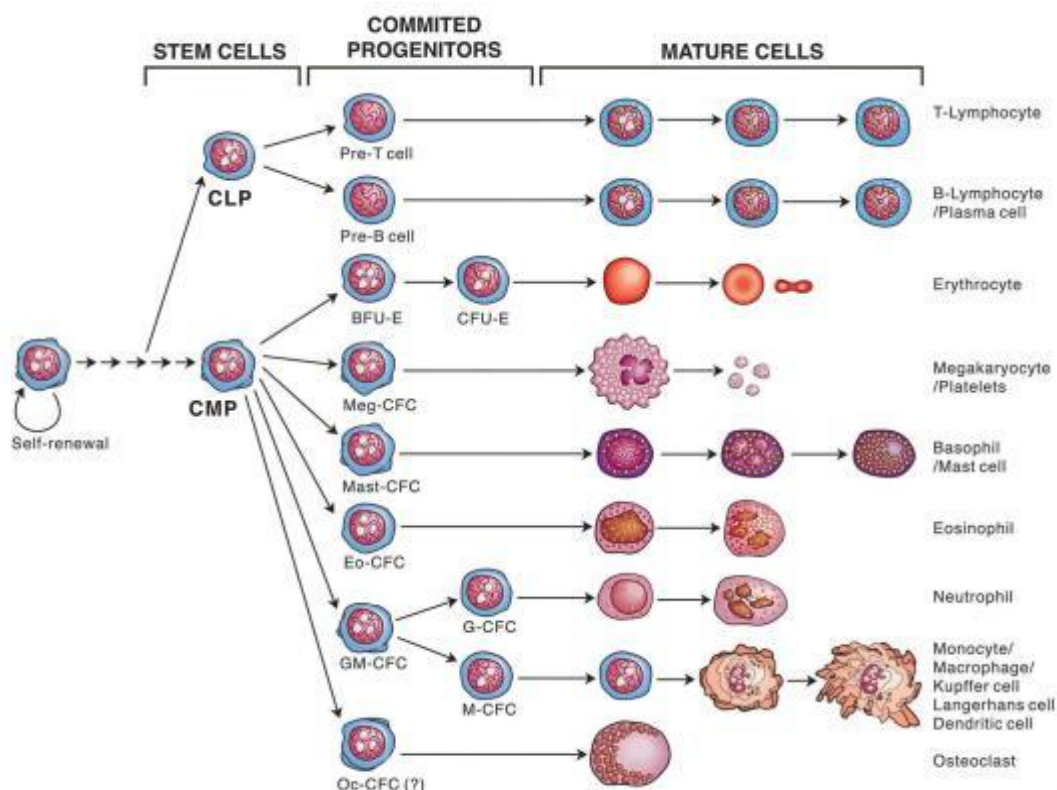
Diferenciace do jednotlivých vývojových řad se děje po vlivem několika vnějších a vnitřních faktorů. Jedná se o působení růstových faktorů (hormonů a cytokinů) a transkripčních faktorů, které iniciují nebo zvyšují expresi potřebných genů (Orkin *et Zon*, 2002).

Hematopoetické růstové faktory se podílejí na tvorbě různých krevních buněk z buněk kmenových, které se nacházejí v kostní dřeni. Původně byly popsány na základě jejich schopnosti podporovat hemopoetický růst kolonií *in vitro*. Geny pro některé z těchto proteinů byly klonovány pomocí rekombinantních technologií a toho se dnes využívá v řadě klinických případů. Myeloidní růstové faktory jsou používány k podpoře krvetvorby pacientů oslabené v důsledku chemoterapie či transplantace kostní dřeně. Také mají potenciál v léčbě infekčních chorob. Například erythropoetin je široce používán u pacientů s anémií a trombopoetin na zmírnění trombocytopenie.

Hematopoetické růstové faktory (Ketley *et* Newland, 1997):

- Erythropoetin (Epo)
- Trombopoetin (Tpo)
- Interleukin 1 (IL-1)
- Interleukin 3 (IL-3)
- Interleukin 6 (IL-6)
- Faktor kmenové buňky (SCF - stem-cell factor)
- Faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF - granulocyte-colony stimulating factor)
- Faktor stimulující kolonie granulocytů/makrofágů (GM-CSF - granulocyte/macrophage-colony stimulating factor)
- Faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF - macrophage-colony stimulating factor)

Obr. č. 1: Schéma hematopoézy



Převzato z: <http://akdarbakin.wordpress.com/2012/04/23/hematopoiesis/>

U dospělých se všechny tyto procesy omezují především do oblasti kostní dřeně. Během těhotenství se však hematopoéza vyskytuje v různých oblastech vyvíjejícího se plodu. Tento proces byl rozdělen do 3 fází: mezoblastická, jaterní a medulární fáze (Rodak *et al.*, 2007).

#### Mezoblastická fáze (fáze žloutkového váčku)

Za počátek hematopoézy se obecně považuje 19. den embryonálního vývoje. Progenitorové buňky mezenchymálního původu migrují do žloutkového váčku a vedou k hematopoetickým kmenovým buňkám (HSCs). Tyto primitivní buňky migrují z periferie do centrální dutiny žloutkového váčku, kde se vyvinou v primitivní erytroblasty. Zbývající buňky obklopující dutinu žloutkového váčku se nazývají angioblasty (budoucí cévy).

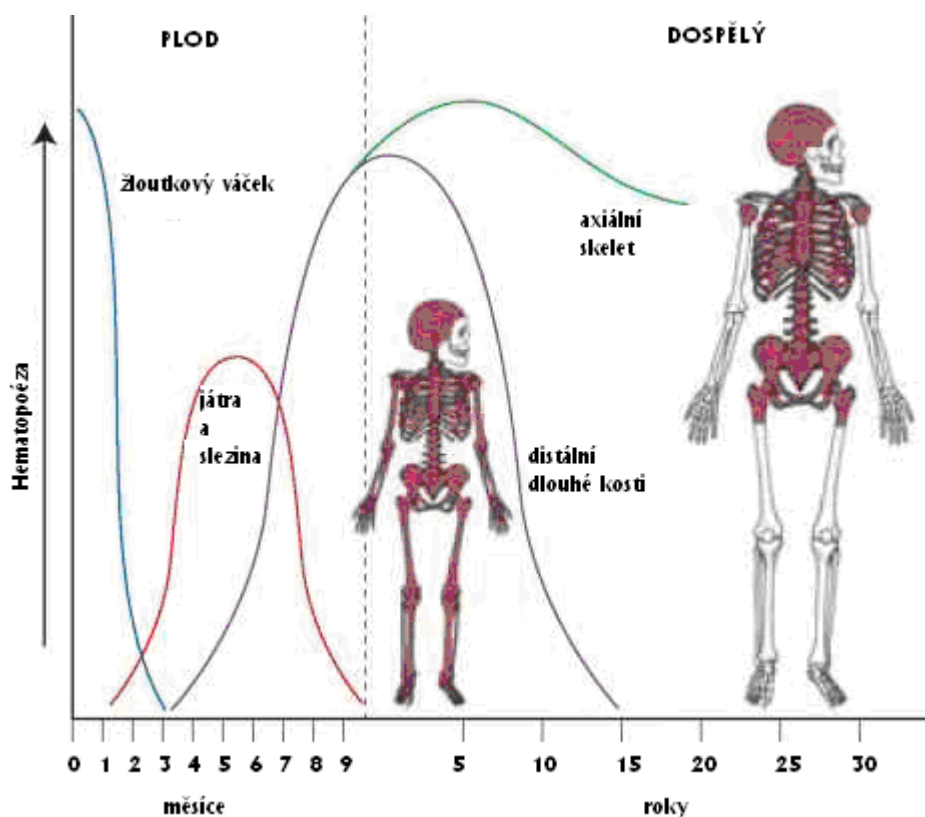
#### Jaterní fáze

Jaterní fáze krvetvorby začíná kolem 4. až 5. týdne gestačního období a je charakterizována rozpoznatelnými skupinami erytroblastů, granulocytů a monocytů. Kromě toho se začínají objevovat lymfoidní buňky. Krvetvorba v této fázi probíhá extravaskulárně a trvá po zbytek vývoje plodu v těle matky až do 1. až 2. týdne po porodu. K hematopoetickému procesu přispívá v této fázi i vývoj sleziny, ledvin, brzlíku a lymfatických uzlin. Brzlík, 1. plně rozvinutý orgán v zárodku, se stává hlavním místem tvorby T-buněk. Ledviny a slezina produkují B-buňky. Vývoj megakaryocytů začíná také během jaterní fáze. Slezina postupně utlumuje tvorbu granulocytů a uplatňuje se pouze v lymfopoéze. Během jaterní fáze je možné detekovat hladinu hemoglobinu Hb E, Hb A, Hb A2.

#### Medulární (myeloidní) fáze

Během 5. měsíce vývoje plodu začíná krvetvorba i ve vyvíjející se dutině kostní dřeně. Myeloidní krvetvorba je zahájena v této fázi vývoje a myeloidní/erytroidní poměr se blíží poměru u dospělých 3:1 do 21 týdnů těhotenství. Do konce 6. měsíce těhotenství se kostní dřeň stává primárním místem krvetvorby plodu. V této fázi jsou měřitelné hladiny erythropoetinu (Epo), faktor stimulační kolonie granulocytů (G-CSF), faktor stimulační kolonie granulocytů/makrofágů (GM-CSF) a fetální Hb. Detekovány mohou být i Hb A2 a Hb dospělých. Ve všech 3 liniích mohou být viditelné i různé fáze zrání.

**Obr. č. 2:** Znárodnění lokalizace hematopoézy u dětí a dospělých v závislosti na čase



*Upraveno dle: <http://www.guwsmedical.info/bone-marrow/wo-r-d-key.html>*

### Poruchy hematopoézy

K poruchám krvetvorby může dojít v jakémkoliv věku a také stádiu vývoje v jakékoliv krevní řadě. Poruchy mohou být jak vrozené tak získané a hlavním rozdělením těchto poruch je na nádorové a nenádorové. Mezi nádorové poruchy se řadí především leukémie, které mohou být chronické a akutní.

## 3.2 Chronická B-lymfocytární leukémie (B-CLL)

### 3.2.1 Obecná charakteristika onemocnění

Chronická B-lymfocytární leukémie (B-CLL) je nízce agresivní hematologická lymfoproliferativní malignita. Vyznačuje se proliferací klonálních, vyzrálých a maligně transformovaných B-lymfocytů, které nekontrolovaně proliferují a mají také porušenou dráhu apoptózy. Dochází tedy k akumulaci těchto B-lymfocytů v krevním oběhu (Adam *et al.*, 2001).

Chronická B-lymfocytární leukémie (B-CLL) je nejčastější leukémie nemocných dospělého věku v západním světě. Je to heterogenní onemocnění s variabilními fenotypovými a biologickými projevy (Bannerji *et Byrd*, 2000). B-CLL postihuje nejčastěji obyvatelstvo starší 50 let, častěji muže než ženy. Může se však vyskytnout i u mladší populace, avšak zde jsou s nemocí spojena vyšší rizika a negativní dopady, např. přechod do Richterova syndromu a další příznaky aktivní choroby (Mauro *et al.*, 2013).

Ke stanovení diagnózy pacientů dochází na základě vyšetření krevního obrazu, kde díky akumulaci B-lymfocytů bývá typická lymfocytóza ( $> 5 \times 10^9/l$ ). Tyto lymfocyty také mívají atypickou morfologii (Cheson *et al.*, 1996). Ke stanovení diagnózy významným způsobem přispívá i průtoková cytometrie (flowcytometrie), která stanovuje imunofenotypizační profil B-lymfocytů. Ty nesou nejčastěji znaky: pozitivní exprese CD5, CD20, případně CD23, nízká exprese sIg (surface imunoglobulin), absence znaku FMC-7 a negativní nebo nízká exprese CD22 (Cheson *et al.*, 1996). Kromě těchto znaků se touto metodou vyšetřují znaky CD38 a ZAP-70, které výrazně ovlivňují prognózu pacientů s B-CLL.

B-lymfocyty dozrávají v kostní dřeni a jejich hlavní funkcí je produkce protilátek – imunoglobulinů. K tvorbě plazmatických B-lymfocytů produkujících imunoglobuliny dochází na základě navázání antigenu na B-buněčný receptor (BCR – B-cell receptor). Imunoglobuliny tvořené těžkými (IgH) a lehkými řetězci (IgL) pak mají stejnou specifitu jako BCR. Geny pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinů se skládají ze segmentů V (*variable*), D (*diversity*), J (*joining*) a C (*constant*), které se tvoří až během zrání v kostní dřeni náhodným přeskupováním (rearrangement) nebo rekombinací V a J segmentů u lehkých řetězců a V, D a J u těžkých řetězců. Tyto B-lymfocyty pak migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde po antigenní stimulaci expandují do germinálního centra lymfoidních folikulů, kde dochází k somatickým hypermutacím. Jedná se o bodové mutace

přeskupených segmentů imunoglobulinů způsobující vyšší afinitu k antigenům (Chiorazii *et al.*, 2005).

Na základě toho, zda B-buňky prošly germinálním centrem, se rozlišují 2 základní subtypy B-CLL, které buď obsahují somatické hypermutace (mutovaný IgVH), nebo ne (nemutovaný IgVH).

**Tab. I:** Znaky korelující s mutovaným/nemutovaným stavem IgVH genu a jejich dopad na přežívání pacienta (Papajík *et al.*, 2006).

	Nemutovaný status IgVH	Mutovaný status IgVH
Exprese ZAP-70	zvýšená	Nezvýšená/mírně zvýšená
Exprese CD38	zvýšená	Mírně zvýšená
TP53	Nefunkční, mutovaný	Funkční, nemutovaný
Chromozómové změny	Nepříznivé (17p-, 11q-, komplexní přestavby)	Příznivé (13q-, normální karyotyp)
Medián přežívání	8 – 10 let	25 let

### 3.2.2 Klinické stážování

Existují dva způsoby klinického stážování B-CLL. První podle Raie *et al.* (1975) a druhý dle Bineta *et al.* (1981).

1. Rai *et al.* navrhli klasifikaci založené na předpokladu, že B-CLL je onemocnění progresivní akumulace nefunkčních lymfocytů. Rozlišují 5 stádií:

**Tab II:** Klinické stážování dle Raie *et al.*

Stádium	Příznaky	Medián přežívání [měsíce]
0	pouze lymfocytóza v krvi a kostní dřeni	> 150
I	lymfocytóza se zvětšenými uzlinami	101
II	lymfocytóza se zvětšenou slezinou a/nebo zvětšená játra	71
III	lymfocytóza s anémií	19
IV	lymfocytóza s trombocytopenií	19



2. Binet *et al.* navrhli klasifikaci složenou ze tří stádií:

**Tab III:** Klinické stážování dle Binet *et al.*

Stádium	Příznaky	Medián přežívání [měsíce]
A	Méně než tři postižená místa, bez anémie a trombocytopenie	Není odlišné od běžné populace
B	Tři nebo více postižených míst, bez anémie a trombocytopenie	84
C	anémie (Hb méně než 10 g) a/nebo trombocytopenie (počet trombocytů méně než 100 000/mm <sup>3</sup> )	24

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

### 3.2.3 Léčba

V běžné praxi se léčba zahajuje až s progresí onemocnění. Pacientům, kteří se nacházejí ve stádiu Rai 0 nebo Binet A, se tedy léčba neindikuje (Dighiero *et al.*, 1998). Také u pacientů s vyšším klinickým zařazením se neindikuje léčba okamžitě. Většinou se čeká na progresi onemocnění či jeho symptomy. Při výskytu autoimunitní hemolytické anémie či imunitní trombopenickou purpurou se pacienti léčí kortikosteroidy, popř. později chemoimunoterapií (Kozák, 2010). Je tedy nutné odlišit pacienty, kteří by měli z časné léčby prospěch a kteří zatím léčbu nepotřebují. K rozlišení dochází na základě několika prognostických faktorů (viz dále, kapitola 3.2.5 - Prognostické faktory B-CLL)

Léčba B-CLL byla dříve postavena na základě spíše neúčinné léčby, jako jsou alkylační agens (chlorambucil). Nicméně v posledních dvou dekadách jsme svědky revoluce v léčbě B-CLL. Díky kombinovanému použití purinových analogů (fludarabin a dalších cytotoxických látek nebo monoklonálních protilátek (alemtuzumab – anti CD52 humanizovaná monoklonální protilátka, rituximab – chimerická monoklonální anti CD20 protilátka), se u vysokého počtu pacientů dosáhne kompletní odpovědi na léčbu (Montserrat, 2005). Dále se také stále častěji uchyluje k transplantaci krvetvorných kmenových buněk (Montserrat, 2004). To vše vede ke snížení počtu pacientů s vyskytující se minimální reziduální chorobou (MRD).

Díky tomu, že se až u 80 % nemocných vyskytují i infekce, kromě samotné léčby B-CLL je podávána i léčba podpůrná. Jedná se především o prevenci a léčbu anémie, infekcí, zvracení, malnutrice a dalších příznaků komplikující život pacientů. Používá se imunizace,

antimikrobiální profylaxe, leukocytární růstové faktory (např. erythropoetin - Rose *et al.*, 1994).

### **3.2.4 Minimální reziduální nemoc (MRD – minimal residual disease)**

I přes veškerá léčebná opatření jsou stále pacienti, u kterých nedojde ke kompletní remisi, a přetrvávající leukemické buňky v oběhu mohou způsobit relaps onemocnění. Proto se v poslední době veškeré úsilí věnuje léčebným metodám, které by kompletně potlačily MRD (Moreton *et al.*, 2005).

Hlavními metodami detekující MRD jsou průtoková cytometrie (Rawstron, 2001) a polymerázová řetězová reakce (PCR), (Provan, 1996). Moreno (2006) uvádí, že pro zachycení MRD jsou přesnější kvantitativní metody (průtoková cytometrie a qPCR) než PCR.

### **3.2.5 Prognostické faktory CLL**

#### **3.2.5.1 Klasické prognostické faktory**

Hlavními obecnými prognostickými markery jsou věk a pohlaví nemocného. I když tyto faktory nejsou zahrnuty do klinického stážování, je známo, že mužské pohlaví je negativní prognostický faktor. Biologická podstata tohoto jevu však není známa (Döhner *et al.*, 2000). Jak už bylo uvedeno výše, starší pacienti mají vyšší medián přežívání. U mladších pacientů dochází k více komplikacím, které výrazně ovlivňují prognózu a stav pacienta (Mauro *et al.*, 2013).

Dále je možné sem zařadit i zdvojovací čas lymfocytů (LDT – lymphocyte doubling time). Jedná se o čas, za který stoupne hladina lymfocytů v krvi na dvojnásobnou hodnotu. Jestliže je tato doba kratší než 12 měsíců, je tento faktor brán jako negativní. I když je tento faktor spíše retrospektivní, dá se odhadnout z jednotlivých vyšetření krevního obrazu (Kozák, 2010).

Dalším negativním faktorem ovlivňujícím B-CLL jsou anémie a trombocytopenie. Dle Halleka je limitní anémie charakterizovaná hladinou hemoglobinu  $< 100 - 110$  g/l a trombocytopenie charakterizovaná množstvím trombocytů  $< 100 \times 10^9/l$  (Hallek *et al.*, 1997). I z hlediska klinických stážovacích systémů (Rai *et al.*, 1975, Binet *et al.*, 1981) je zřejmé, že pacienti mají horší prognózu a celkové přežívání - zařazení do stádia C dle Bineta a III/IV dle Raie. I z hlediska klinických stážovacích systémů (Rai *et al.*, 1975, Binet *et al.*,

1981) je zřejmé, že horší prognózu a kratší celkové přežívání mají pacienti zařazení do stádia C dle Bineta a III/IV dle Raie.

### 3.2.5.2 Molekulární prognostické faktory

#### **Mutační status IgVH**

Dle formy, v které se nachází IgVH (mutovaná/nemutovaná), byla B-CLL rozdělena na dvě podmnožiny. Na základě fáze B-buněčné diferenciaci, kdy jsou buňky transformovány, se mohou vyvinout buď buňky, ve kterých není zaneseno zárodečné centrum, a nevykazují tedy přítomnost VH hypermutace, nebo B-buňky, které vykazují časté změny ve VH sekvencích - prošly zárodečným centrem. B-CLL pacienti s a bez VH somatických hypermutací mají různé klinické znaky (Hamblin *et al.*, 1999; Damle *et al.*, 1999).

Pacienti s nemutovanými geny IgVH mají vyšší pravděpodobnost výskytu CD38+ B-lymfocytů než pacienti s mutovaným IgVH genem. Pacienti s nemutovaným IgVH a CD38+ špatně reagují na léčbu (včetně fludarabinu) a mají kratší přežívání. Naproti tomu, pacienti s mutovaným IgVH a CD38- často nevyžadují léčbu a žijí déle. To platí i pro ty pacienty, kteří jsou zařazení do střední kategorie stádia Rai. Také bylo zjištěno, že mutované IgVH se vyskytuje rovnoměrně jak u žen, tak u mužů. Avšak nemutované IgVH a CD38+ jasně převažuje u mužů. Jedná se tedy o přesné prediktory klinického obrazu pacientů s B-CLL (Damle *et al.*, 1999).

Avšak o mutovaném IgVH konkrétně v genech VH3-21 se v posledních letech mluví jako o významném negativním prognostickém faktoru. Mutace v genu VH3-21 je spojena s vyšším výskytem delece genu TP53 (Tobin *et al.*, 2002).

#### **Expresse CD38**

Gen pro lidský CD38 se nachází na chromozómu 4 (Malavasi *et al.*, 1994), exprimuje se jako jednořetězcový transmembránový glykoprotein ( $M_r = 45$  kD), který je široce exprimován řadou krevních buněk. Molekula CD38 se skládá z tří oblastí: intracelulární (20 AMK), transmembránové (23 AMK) a extracelulární (257 AMK), (Alessio *et al.*, 1990). Má funkci jak enzymu, tak receptoru. V normální zralé B-buňce, je jeho exprese omezena na zárodečná centra sekundárních lymfoidních folikulů. V dnešní době je již zřejmé, že CD38

exprese u pacientů s B-CLL je spojena s krátkým přežitím a nemutovaným stavem IgVH (Damle *et al.*, 1999, Kröber *et al.*, 2002)

Delece 11q23, absence delece 13q14, atypická morfologie lymfocytů a CD38+ (více než 30 % B-lymfocytů) jsou významně spojeny s přítomností nemutovaného IgVH genu. Mužské pohlaví, atypická morfologie B-lymfocytů, více než 30 % CD38+, trizomie 12, delece 11q23, ztráta nebo mutace genu TP53 a nemutované IgVH - to vše jsou špatné prognostické faktory. Medián přežití u pacientů s mutací IgVH genu je 310 měsíců, s nemutovaným IgVH genem 119 měsíců, zatímco přežití nemocných s delecí nebo mutací genu TP53 bez ohledu na stav IgVH je pouze 47 měsíců (Oscier *et al.*, 2002).

### **Míra exprese ZAP-70**

Dalším důležitým faktorem ovlivňující prognózu pacientů s B-CLL negativním způsobem je exprese ZAP-70. Je to člen tyrozinkinázové rodiny proteinů, obvykle exprimován T- a NK-buňkami a iniciuje signalizaci T-buněk. Všichni pacienti ve stádiu Binet A s pozitivní expresí ZAP-70 mají výrazně rychlejší a vyšší progresi onemocnění než pacienti ve stejném stádiu bez exprese ZAP-70. Pozitivita ZAP-70 také výrazně koreluje s nálezem nemutovaného IgVH genu (Crespo *et al.*, 2003).

Stejně jako výše uvedené molekulární prognostické faktory je ZAP-70 faktor negativní, související s progresí onemocnění, kratším přežíváním a nálezem dalších negativních faktorů - molekulárních i cytogenetických.

### **MicroRNA**

MicroRNA jsou posttranskripčními regulátory genové exprese a jejich přítomnost v buňkách je fyziologická. Jsou zapojeny do regulací několika procesů buněčné diferenciaci, proliferace, apoptózy i hematopoézy (Kim *et al.*, 2007).

Jedinečné profily exprese microRNA mohou být použity k odlišení normální B-buňky a maligních B-lymfocytů u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (B-CLL). Je možné odlišit i případy B-CLL s nízkou/vysokou úrovní exprese ZAP-70, mutovaným/nemutovaným genem IgVH, což souvisí s případnou progresí onemocnění. Některé miRNA mohou mít funkci protoonkogenů, jiné zase tumorsupresorů. Mutace v microRNA transkriptech jsou časté a mohou mít funkční význam (Calin *et al.*, 2005).

U pacientů s B-CLL (až 68 %) se nejčastěji vyskytuje delece nebo snížená/změněná exprese dvou microRNA: miR-16-1 a miRNA-15a v oblasti 13q14. Jako jejich pravděpodobný cíl se považuje Bcl-2 - antiapoptotický protein (Calin *et al.*, 2002).

### 3.2.1.3 Další prognostické faktory

Dalšími negativními prognostickými faktory jsou např. exprese lipoproteinlipázy účastníci se aktivace B-lymfocytů (Veer *et al.*, 2006), nadměrná aktivita telomerázy zajišťující stabilitu a vyšší životnost nádorové populace buněk (Grabowski *et al.*, 2005), hladina proteinů Bcl-2/Bax, které udržují rovnováhu proliferace a apoptózy (Aguilar-Santelises *et al.*, 1996).

Jako sérové faktory se udávají thimidinkináza krevního séra sloužící jako marker proliferační aktivity nádorových buněk (Raimondo *et al.*, 2001), nízkomolekulární membránový protein  $\beta$ -2 mikroglobulin (s $\beta$ 2M) predikující vyšší aktivitu B-CLL (Tötterman *et al.*, 1986) a také vaskulární endoteliální růstový faktor (sVEGF), který syntetizuje a uvolňuje nádorové B-lymfocyty (Chen *et al.*, 2000).

### 3.2.1.4 Cytogenetické a molekulárně-cytogenetické prognostické faktory

Díky fluorescenční *in situ* hybridizaci se zlepšila detekce genomových aberací u pacientů s B-CLL. Döhner *et al.* (2000) uvádí výskyt chromozomálních aberací u 82 % případů. Nejčastějšími změnami byly delece 13q (55 %), delece 11q (18 %), trizomie 12 (16 %), delece 17p (7 %) a delece 6q (6 %). Dle statistického modelu bylo definováno pět kategorií rozdělených dle mediánu přežívání:

**Tab IV:** Přežívání pacientů s různými genetickými změnami s léčbou a bez léčby.

genetická abnormalita	medián přežití [měsíce]	medián přežití bez léčby [měsíce]
Delece 17p (TP53)	32	9
Delece 11q (ATM)	79	13
Trizomie 12	114	33
Normální karyotyp	111	49
Delece 13q14 (jako jediná abnormalita)	133	92

*převzato z: Kozák, 2010*

Pacienti ve skupinách s delecí 17p a 11q měli pokročilejší onemocnění než pacienti v ostatních třech skupinách. Pacienti s delecí 17p měli nejkratší medián bez léčby - 9 měsíců, pacienti s delecí 13q zase nejdelší - 92 měsíců. Dále uvádí, že přítomnost nebo nepřítomnost

delece 17p, přítomnost nebo nepřítomnost delece 11q, věk, stádium dle Bineta, úroveň laktát dehydrogenázy a bílých krvinek dává významnou prognostickou informaci. Genomické aberace u pacientů s B-CLL jsou důležitými nezávislými predikátory progresu onemocnění a přežití. Tyto nálezy mají vliv na návrh léčebné strategie.

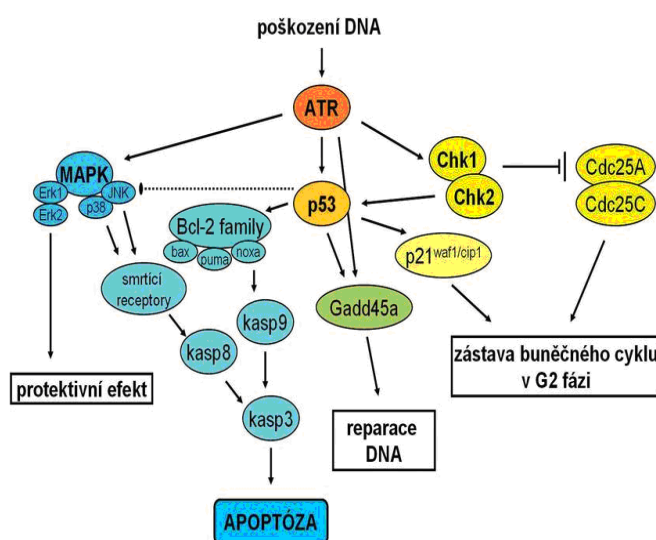
### Delece TP53

Protein p53 je kódován genem TP53, který leží na krátkých ramenech chromozómu 17 (17p13). Jedná se o nejvýznamnější tumor-supresorový gen též nazývaný strážce genomu. Má významnou roli při opravách DNA a obraně buněk proti genotoxickému/onkogennímu stresu, hypoxii a dalším kritickým změnám. Funguje také jako transkripční faktor, který spouští transkripci genů zapojených do mnoha buněčných procesů. Při stresu je stabilizován kinázou ATM, zastavuje buněčný cyklus a spouští opravy DNA, popř. apoptózu (Lane, 1992).

Delece TP53 je známá svou velmi špatnou prognózou. Pacienti s delecí TP53 mají nejkratší medián přežití a jsou u nich většinou detekovány další negativní prognostické markery - nemutovaný IgVH status, pozitivní exprese CD38 a ZAP-70 (Papajík *et al.*, 2006).

Dicker *et al.* (2009) zjistili, že mutace TP53 jsou signifikantně spojeny s delecí 17p a komplexními cytogenetickými abnormalitami. Pacienti s abnormalitami TP53 mají významně snížený čas na léčbu ve srovnání s pacienty bez aberací TP53.

**Obr. č. 3:** Zjednodušené schéma p53 dráhy.



Převzato z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/molekularni-mechanismy-ucinku-cisplatiny-455575>

U pacientů s delecí jedné alely TP53 se často vyskytuje i mutace zbývající alely a i u pacientů bez delecce TP53 může být snížena regulace exprese genů na 17p (Fabris *et al.*, 2008). Pacienti s delecí TP53 mají také významně vyšší procento prolymfocytů a výrazně nižší procento zbytkových CD3+ T-lymfocytů. Výrazně se pak zvyšuje fáze Bineta ze stupně A na B, popř. C (Cordone *et al.*, 1998).

V mnohorozměrné analýze Mayra *et al.* (2006) také potvrdili, že komplexní změny karyotypu, delecce/translokace 17p, exprese CD38 jsou prognostickými faktory s nejvyšším nepříznivým dopadem na klinické výsledky. Delecce 17p předpovídá, že pacient nebude odpovídat na léčbu purinovými analogy. 17p je tedy nejsilnější prognostický faktor související s přežitím pacientů (Döhner *et al.*, 1995).

### **Delece ATM**

Gen ATM (ataxia telangiectasia mutated) se nachází na chromozómu 11 v pruzích q22-q23, skládá se z 66 exonů a má 146 kbp. Gen kóduje 370-kD jaderný fosfoprotein homologní s fosfatidylinositol-3-kinázou (PI-3-K). PI-3-K příbuzné bílkoviny fungují v DNA opravách, DNA rekombinaci a kontrole buněčného cyklu. Gen je zodpovědný za autozomálně recesivní onemocnění ataxia telangiectasia (A-T). A-T je charakterizováno jako onemocnění způsobující neurologickou degeneraci, imunodeficit, neplodnost, radiační citlivost a výraznou náchylnost k rakovině (Savitsky *et al.*, 1995a, b). Nejčastěji se jedná o nádory lymfatické soustavy, včetně nádorů B- a T-buněk (Taylor *et al.*, 1996). Pacienti s delecí ATM mají přibližně 70 krát vyšší riziko vzniku leukémie než běžná populace. Bialeické mutace genu ATM byly zjištěny také u pacientů s T-prolymfocytární leukémií (Stilgenbauer S. *et al.*, 1997). Dochází jak k delecím jedné alely genu ATM a mutacím druhé alely (vede k aberantnímu přepisu, sestřihu a tedy změně nebo zkrácení proteinu), tak k mutacím obou alel genu (Schaffner *et al.*, 1999). Delece ATM způsobuje u pacientů rozsáhlá postižení lymfatických uzlin a je spojena se špatným přežíváním pacientů. Jedná se tedy o výrazný negativní prognostický faktor pro pacienty s B-CLL.

Kromě vysoké náchylnosti k rozvoji leukémie a lymfomu jsou pacienti s delecí ATM přecitlivělí ke dvojitým zlomům DNA (DSBs - double stranded breaks) - ATM je součástí biochemických cest spojující opravy DSBs, regulaci buněčného cyklu a programovanou buněčnou smrt. Některé z biologických funkcí ATM jsou regulovány prostřednictvím p53 fosforylace a aktivace dráhy p53. Mutované nebo deletované ATM tedy způsobuje vady v p53 dráze (Shiloh, 1997).

Inaktivace genu ATM představuje molekulární událost, která vede ke vzniku samostatné podmnožiny B-CLL. ATM mutace jsou omezeny na B-CLL s pregerminální charakteristikou buněk. Zde pak k inaktivaci ATM dochází nezávisle na změnách TP53 genu a funkční ztráta ATM určuje odlišné buněčné odpovědi na poškození DNA. ATM má roli v prevenci i hromadění buněk, při B-buněčné diferenciaci nese poškození na DNA a vede k následnému vývoji nádorů u pregerminálních fází buňky.

Nestává se, že by pacienti nesli delecí ATM a zároveň delecí, popř. mutaci TP53. Prokázala se nepřítomnost proměnného somatického regionu pro těžký řetězec hypermutace pregerminálního centra buněk a společná patogeneze těchto nádorů. Kromě toho, u některých pacientů ATM mutace předcházela transformaci fáze diferenciaci. ATM tedy pravděpodobně hraje důležitou roli v pregerminálním centru.

### **Delece 13q14**

Delece 13q14 je nejčastější genetickou změnou vyskytující se u pacientů s B-CLL. Je pozoruhodné, že je spojena s příznivou prognózou. Pacienti mají vyšší medián přežívání i v porovnání s pacienty s normálním karyotypem (Döhner *et al.*, 2000).

Do delece 13q14 může být zahrnuto více oblastí. Jedná se o gen RB1, oblast D13S319 a microRNA (miR-15a a miR-16-1), (viz výše, kapitola 3.2.1.2), které mohou mít vliv na regulaci genu Bcl-2 (Calin *et al.*, 2002, 2005). Kromě varianty monoalelické delece se u pacientů s B-CLL vyskytuje také bialelická delece 13q14, popř. obě varianty zároveň. Pozitivní dopad však má pouze monoalelická delece 13q14, bialelická delece svědčí spíše pro progresi onemocnění (Chena *et al.*, 2008).

### **Trizomie chromozómu 12**

U pacientů s B-CLL se jako jedna z nejčastějších numerických změn vyskytuje právě trizomie chromozómu 12. Tato změna byla zjištěna jako první genetická změna u B-CLL vůbec. I přesto není znám přesný prognostický význam. Většina pacientů je však zařazených do středních či vyšších klinických stádií. Byla pozorována stejně v typické i atypické formě B-CLL (Matutes *et al.*, 1996).

Jedním z kandidátních genů lokalizovaných na 12. chromozómu je MDM-2 onkogen (12q13-14), (dalšími například k-ras-2, int-1, CCND2), avšak ani zde nebyla potvrzena asociace s B-CLL. Je v autoregulační zpětné vazbě s nádorovým supresorem p53. Z tohoto



důvodu mohla hrát intracelulární hladina těchto dvou proteinů důležitou roli v buněčné proliferaci a nádorech. Nicméně se statisticky významná korelace mezi expresí MDM-2 proteinu a klinickou etapou onemocnění nepotvrdila (Haidar *et al.*, 1997).

V některých případech se dokonce s trizomií 12 zároveň objevuje trizomie 19 (Juliusson *et Merup*, 1998). Dle studie Ibbotson *et al.* (2012) se trizomie 12 a 19 vyskytuje v 2,1 % ze všech pacientů s trizomií 12.

### **Duplikace C-MYC (8q24)**

MYC (8q24) je onkogenní transkripční faktor, který pozitivně reguluje buněčný cyklus. U nemocných se nejčastěji vyskytuje varianta duplikace MYC, což je nepříznivý prognostický faktor. Krysov *et al.* (2012) zjistili, že indukce MYC je závislá na MEK/ERK signální dráze a kinetika ERK1/2 aktivace je rozhodujícím činitelem MYC indukce. Je tedy pravděpodobné, že hraje důležitou roli v antigenem indukované proliferaci buněk u pacientů s B-CLL.

Další ne tak častou možností je přestavba genu MYC, která je píše spojená s jinými diagnózami (př.: lymfomy, mnohočetné myelomy). U B-CLL byla tato změna pozorována převážně u pacientů pokročilého věku a mužského pohlaví. Může spíše znamenat progresi B-CLL nebo transformaci do jiného onemocnění. MYC translokace byly často pozorovány s nepříznivými cytogenetickými markery jako je například del(11q), del(17p), monozomie 17. Doba přežití je pak výrazně kratší. Duplikace nebo translokace jsou spojeny s nepříznivými prognostickými rysy (Put *et al.*, 2012).

### **Delece 6q21**

Delece postihující dlouhé rameno chromozómu 6 (6q) patří mezi nejčastěji pozorované chromozómové aberace lymfoidních malignit a byly identifikovány jako negativní prognostický faktor. Co se týká B-CLL, delece v 6q21 se vyskytuje u 7 % pacientů (Stilgenbauer *et al.*, 1999). Není známo, které konkrétní geny na 6q jsou zodpovědné za lymfoproliferace, ale Urbánková *et al.* (2012) uvádí jako kandidátní gen FOXO3A.

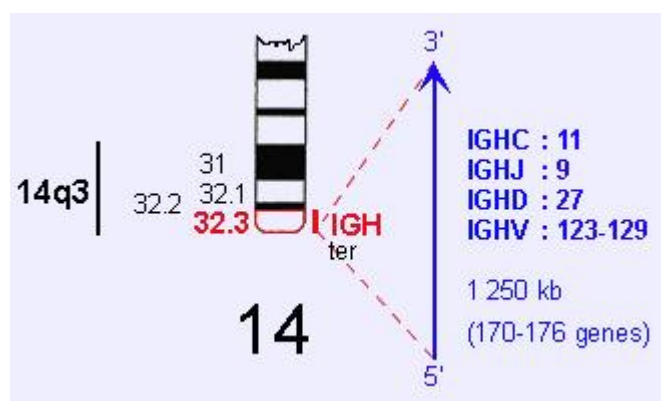
Delece 6q21 se jako primární změna u pacientů s B-CLL téměř nevyskytuje. Je to charakteristická sekundární změna spojená s progresí onemocnění. Pacienti s touto abnormalitou měli významně snížený interval přežití ve srovnání s ostatními pacienty (Finn *et al.*, 1998).

Analýzy klinických charakteristik a laboratorních parametrů ukázaly, že pacienti s delecí 6q měli vyšší počet bílých krvinek a rozsáhlejší lymfadenopatii (Stilgenbauer *et al.*, 1999). Nález delece 6q21 je spojen i s dalšími negativními změnami: atypickou morfologií lymfocytů, častou splenomegalií, CD38+ a krátkým přežíváním (Cuneo *et al.*, 2004).

### Přestavba IgH

Gen pro těžký řetězec imunoglobulinů je další oblastí, která se zapojuje do chromozómových přestaveb u pacientů s B-CLL. Nachází se na chromozómu 14 (14q32.33). Obecně má přestavba IgH negativní prognózu, po translokaci do blízkosti onkogenu spouští jeho transkripci, což může mít fatální následky (Berkova *et al.*, 2008).

**Obr. č. 4:** Schéma znázorňující gen pro IgH.

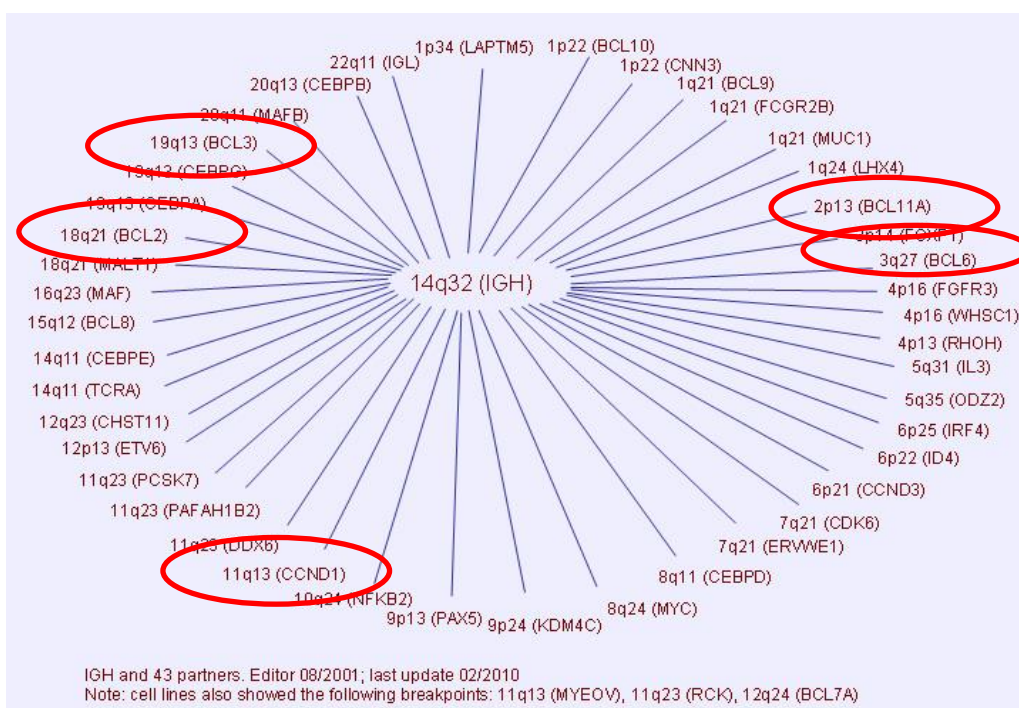


Převzato z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/IgHID40.html>

Translokace tohoto genu není u pacientů s B-CLL tak častá (~ 4 %), (Döhner *et al.*, 2000). Kromě translokací genu se setkáváme i s jinými variantami - např. delecí 3' konce IgH, což má negativní prognózu (Berkova *et al.*, 2008), nebo delecí 5' konce IgH genu, která se uvádí jako fyziologická delece (FD) - nemá vliv na prognózu pacienta. Bylo zjištěno, že tato delece souvisí s fyziologickými procesy při přestavbách a rekombinacích V, D, J segmentů (Włodarska *et al.*, 2007). V práci Rivera *et al.* (2009) se FD vyskytuje dokonce u 82 % pacientů.

Mezi geny, které jsou jeho nejčastějšími partnery u pacientů s B-CLL, patří: BCL11A (2p13), BCL6 (3q27), BCL2 (18q21), BCL3 (19q13), CCND1 (11q13), (<http://atlasgeneticsoncology.org>).

**Obr. č. 5:** Výčet translokačních partnerů s IgH s vyznačenými partnery charakteristickými pro B-CLL.



Upraveno dle: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/IgHID40.html>

### Zmnožení krátkého ramene chromozómu 2 (2p+)

Zmnožení krátkého ramene 2. chromozómu není častou změnou vyskytující se u pacientů s B-CLL, avšak jedná se o aberaci zhoršující pacientovu prognózu. Jarošová *et al.* (2010) uvádí výskyt 2p+ u 8 % nemocných (detekováno pomocí CGH a aCGH). Byl identifikován minimální rozsah zmnožení o velikosti 64 Mbp, v oblasti 2p13 - 2p25, kde jsou lokalizovány 3 známé onkogeny: REL (2p16), ALK (2p23) a MYCN (2p24). Samostatně se tato změna nevyskytuje, provází další chromozómové změny - delecí 13q, 11q, 17p a 6q. Zmnožení 2p se může vyskytovat v několika variantách: různé derivované chromozómy, částečné trizomie. Duplicitní 2p sekvence bývá také zapojena do nevyvážených translokací s dalšími chromozómy (př. dicentrický chromozóm dic(14;18)). Zmnožení 2p+ je tedy součástí dalších,

často komplexních chromozómových změn, souvisejících s progresí onemocnění (Jarošová *et al.*, 2010).

Celkově bylo zmnožení 2p mnohem častější u nemocných s nálezem nepříznivých cytogenetických delecí (ATM, TP53), nemutovaným statutem IGVH, expresí CD38 a ZAP-70. Skupina Fabris *et al.* (2013) identifikovala u nemocných s duplikací 2p významně zvýšenou expresi genů NCOA1 a ROCK2, lokalizovaných na 2p, a CAV1 na 7q31.1. Bylo také prokázáno, že tyto geny hrají rozhodující roli v progresi B-CLL.

Dle studie Chapiro *et al.* (2010) byl u pacientů se zmnožením REL zároveň potvrzen nemutovaný status IgVH a zmnožení MYCN bylo asociováno s vyšší expresí mRNA.

### 3.3 Cytogenetika

Od roku 1970 jsou chromozómy identifikovány na základě jejich velikosti a pozice centromery. To umožňuje chromozómy zařazovat do skupin, ale ne je jednoznačně identifikovat. To je možné až se zavedením pruhovacích technik - Q-, C-, R-, Ag-NOR-, SCE- nebo G-bandingu (Strachan *et Read*, 1999). Jejich základem je heterogenní struktura a funkce savčích chromozómů. Dvěma nejčastěji používanými technikami jsou G-banding (Giemsovo pruhování) a R-banding (reverzní pruhování). Každý pruh je charakterizován změnami v genové hustotě, dobou replikace, základním složením, hustotou opakujících se sekvencí a strukturou chromatinu. R a G pruhovací techniky jsou vzájemně komplementární a představují oddělené části euchromatinu a heterochromatinu lidského genomu. R bandy jsou bohaté na GC báze, G bandy jsou naopak bohaté na AT báze (Craig *et Bickmore*, 1993).

Pomocí pruhovacích technik je možné určovat různé translokace, subchromozomální delece a další. Sestava všech chromozómů je popsána v karyotypu, který uvádí celkový počet autozómů a pohlavních chromozómů. Normální karyotyp ženy je 46,XX a muže 46,XY. Abnormality a změny v chromozómech se přesně zapisují do karyotypu dle pravidel nomenklatury ISCN - An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Pomocí G-bandingu je možné zachytit delecii cca 4 Mbp. Pro bližší identifikaci a rozlišení je lepší využít metody FISH (Strachan *et Read*, 1999).

## 3.4 Molekulární cytogenetika

### 3.4.1 FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je široce používaná metoda pro lokalizaci specifických genomických oblastí, a to jak v metafázi tak interfázi. Aplikace FISH nejsou omezeny na mapování genů nebo studie genetických přestaveb u lidských onemocnění, FISH se využívá ke zkoumání organizace genomu v různých organizmech (Garimberti *et Tosi*, 2010).

Jedná se o metodu zahrnující přípravu dvou hlavních částí: značené DNA sondy a cílové DNA (pacientova), na kterou sonda hybridizuje. DNA sondy většinou pochází ze zdrojů, jako jsou plazmidy, cosmidy, PAC, YAC, BAC. Vyčištěná DNA pak může být označena pomocí fluorochromu nebo barviva konjugovaného s nukleotidy. Sonda se pak váže do interfázních buněk pacienta nebo na mitotická jádra - metafáze. Sonda i cílová DNA se po denuraci do jednovláknového stavu společně hybridizuje (24 hodin), tím dojde k naznačení pacientovy DNA. Vzorek je pak připraven k vizualizaci pomocí fluorescenční mikroskopie. Úspěšná interpretace FISH techniky je závislá na kvalitě výchozích materiálů, účinnosti hybridizace, přesnosti post-hybridizačního mytí a detekci (Bayani *et Squire*, 2004).

### Ideogramy

Nejčastěji používanými sondami v naší laboratoři jsou sondy firmy Abbott, Kreatech, Dako a MetaSystems. Konkrétním panelem sond na B-CLL jsou:

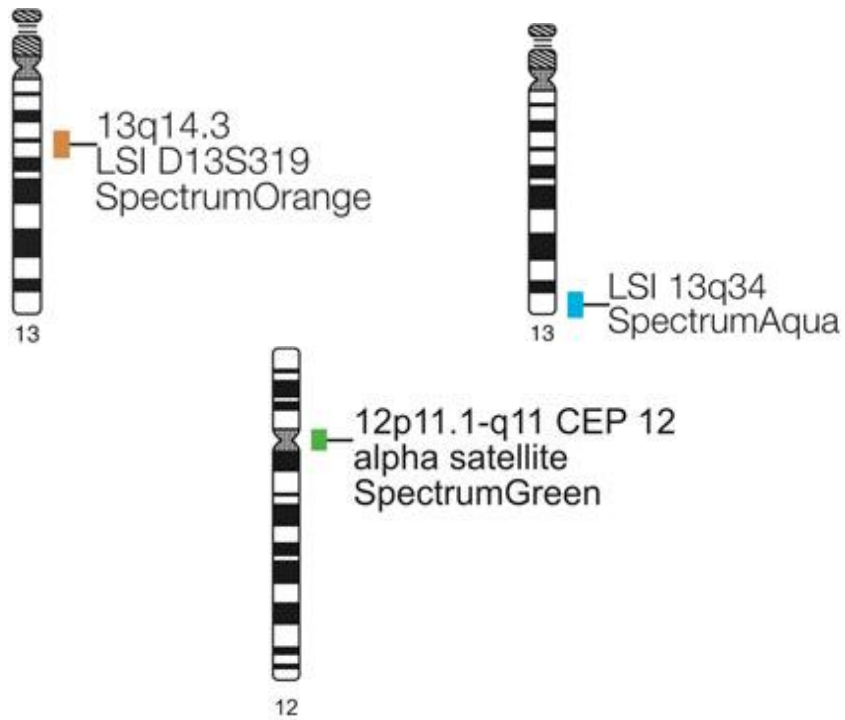
LSI 13q14(D13S319)/13q34/cep12 Abbott

LSI ATM/TP53 Abbott

ON IgH Kreatech (popř. XL IgH MetaSystems)

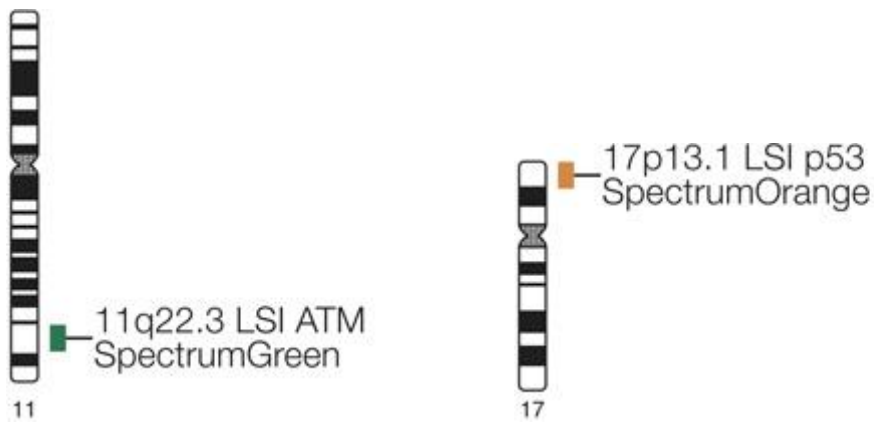
ON 6q21/8q24 Kreatech (popř. XL 6q21/6q23 MetaSystems, LSI MYC Dako)

**Obr. č. 6:** Ideogram sondy firmy Abbott: LSI 13q14 (D13S319)/13q34/cep12



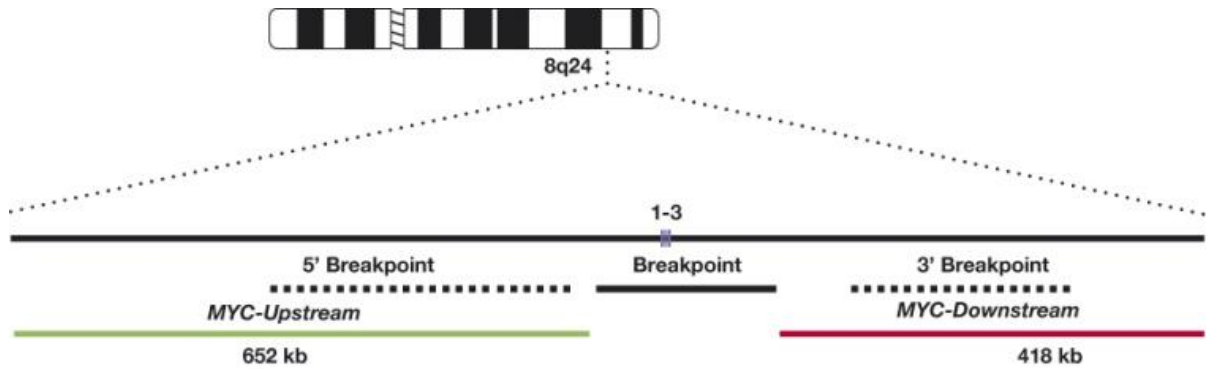
Převzato z: <http://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/hematology-probes.html>

**Obr. č. 7:** Ideogram sondy firmy Abbott: LSI ATM/TP53



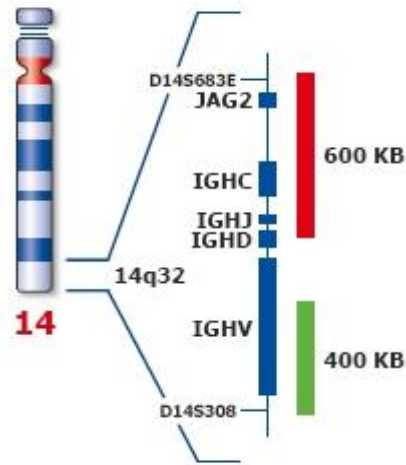
Převzato z: <http://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/hematology-probes.html>

**Obr. č. 8:** Ideogram sondy firmy DAKO: LSI MYC



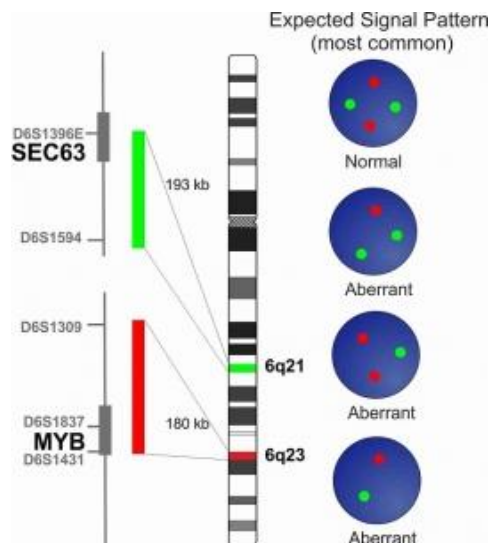
Převzato z: [http://www.dako.com/dist/ar42/p234690/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar42/p234690/prod_products.htm)

**Obr. č. 9:** Ideogram sondy firmy Kreatech: ON IgH



Převzato z: <http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology.html>

**Obr. č. 10:** Ideogram sondy firmy MetaSystems: XL 6q21/6q23



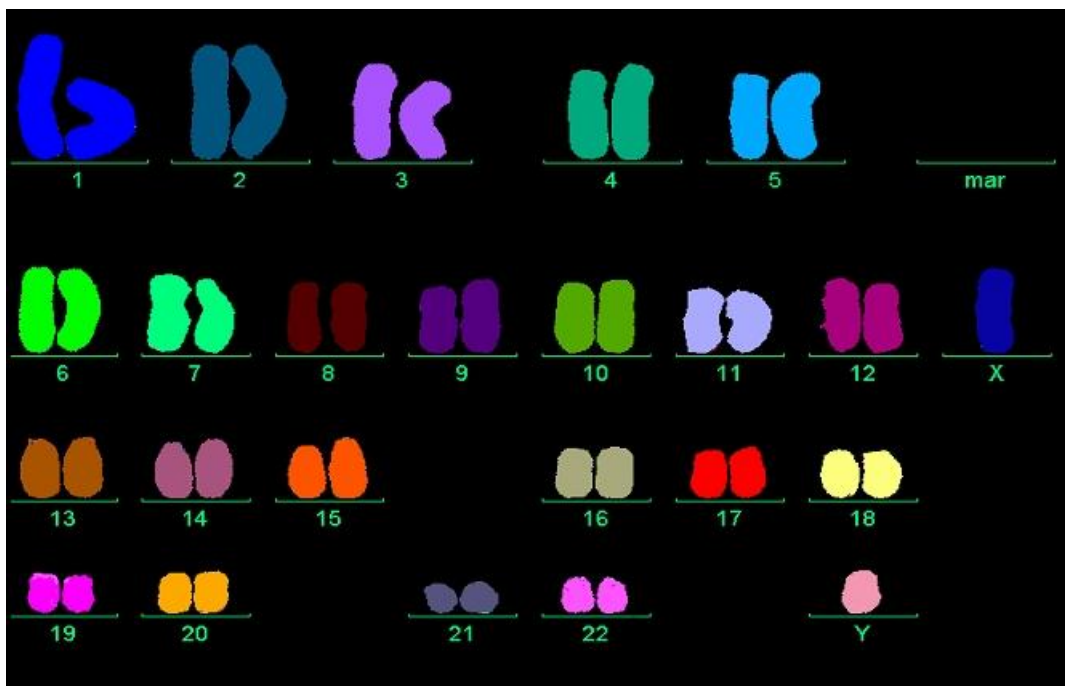
Převzato z: <http://www.alogo.cz/search/web/index.php?&app=probes&ch=6>

### 3.4.2 M-FISH (multicolor FISH - mnohobarevná FISH)

Současné a jednoznačné rozlišování všech lidských chromozómů v různých barvách jsou významné z klinického i biologického hlediska (Schröck *et al.*, 1996).

Speicher *et al.* (1996) vyvinuli sady filtrů a počítačový software pro detekci 27 různých DNA sond hybridizovanýchmi současně. Pro analýzu karyotypu byly lidské chromozómy (ve fázi metafáze) naznačeny - každý jinou kombinací fluorochromů. Je tak možné rychle určit jednoduché i složitější chromozomální přestavby. Dle klasické FISH je pak možné domapovat přesné pozice zlomů translokovaných chromozómů. M-FISH má široký význam z hlediska kliniky a doplňuje tak standardní cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření, zejména při nálezů komplexních změn v karyotypu pacienta.

**Obr. č. 11:** Výsledek M-FISH zdravého pacienta (46,XY)





## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

U pacientů s B-CLL se pro cytogenetické vyšetření nejčastěji odebírá periferní krev (PK), popř. kostní dřeň (KD; BM, bone marrow) nebo uzlina (UZL). Princip zpracování je však stejný u všech odběrů.

#### 4.1.1 Kultivace biologického materiálu

##### Kultivace lymfocytů periferní krve (PK)

1. Krev se odebírá do odběrové zkumavky s protisrážlivým činidlem (heparinem).
2. Připravené kultivační médium (15 ml) se pro větší výtěžnost kultivace rozdělí po 5 ml do tří kultivačních nádob, do každé se pak přidá PK dle počtu lymfocytů (viz Tab V).
3. Do média s PK se pipetuje 15  $\mu$ l IL 2 (interleukin 2) a oligonukleotidy (100  $\mu$ l DSP30 nebo 10  $\mu$ l EKAMPO 10).
4. Kultivační nádoby se na dobu cca 72 hodin umístí do termostatu nastaveného na 37 °C, kultivace probíhá v CO<sub>2</sub>.
5. Po 48 hodinách kultivace se do každé kultivační nádoby přidá 12  $\mu$ l colcemidu a kultivace pokračuje dalších 24 hod.
6. Po těchto 24 hodinách se ukončí kultivace a pokračuje se zpracováním (viz níže - kapitola 4.1.2).

**Tab V:** Objem periferní krve pro kultivaci s IL2 a oligonukleotidy (DSP 30 nebo EKAMPO 10) podle počtu leukocytů

Počet leukocytů	Objem krve ( $\mu$ l)	Počet leukocytů	Objem krve ( $\mu$ l)
5	2000	40	250
6	1670	41	244
7	1430	42	238
8	1250	43	233
9	1110	44	227
10	1000	45	222
11	910	46	217
12	830	47	213

**Tab V, pokračování:** Objem periferní krve pro kultivaci s IL2 a ologonukleotidy (DSP 30 nebo EKAMPO 10) podle počtu leukocytů

Počet leukocytů	Objem krve (μl)	Počet leukocytů	Objem krve (μl)
13	770	48	208
14	710	49	204
15	670	50	200
16	630	51	196
17	590	52	192
18	560	53	189
19	530	54	185
20	500	55	182
21	480	56	179
22	450	58	172
23	430	60	167
24	420	62,5	160
25	400	65	154
26	380	67,5	148
27	370	70	143
28	360	72,5	138
29	340	75	133
30	330	77,5	129
31	323	80	125
32	313	82,5	121
33	303	85	118
34	294	87,5	114
35	286	90	111
36	278	92,5	108
37	270	95	105
38	263	97,5	103
39	256	100	100

## Kultivace lymfocytů kostní dřene

1. Kostní dřeň se odebírá do připravených kultivačních médií N a H v kultivačních nádobách.
2. Pro přímé zpracování se používá médium N (složení viz Tab. VI), ke kterému se přidává colcemid (2 kapky), inkubuje se 30 min a dále se už jen zpracovává (viz níže - kapitola 4.3.1).
3. Pro zpracování pro 24hod kultivaci se KD odebírá do média H (složení viz Tab. II). Médium s buňkami z KD se dále přelije do 15ml zkumavek Falcon a centrifuguje se při 1000 rpm, 37 °C 10 min. Supernatant se odsaje a buňky se přenesou pipetou do kultivační nádoby s médiem K24, takto se nechá kultivovat 24 hod při 37 °C.
4. Po inkubaci se přidají 2 kapky colcemidu na 30 min, pokud nebyly přidány předchozí den. Poté se materiál zpracovává (viz níže - kapitola 4.1.2).

**Tab. VI:** Přesné složení kultivačních medií pro zpracování biologického materiálu k cytogenetickému vyšetření.

N médium	H médium	K24 médium
10 ml RPMI 1640	10 ml RPMI 1640	10 ml BM média
2 kapky heparinu	2 kapky heparinu	
2,5 ml telecího séra		

## Kultivace lymfocytů z uzliny (UZL)

1. Vzorek uzliny se vkládá do 50ml zkumavky Falcon s 10 ml kultivačního média (BM).
2. Zkumavka s uzlinou se ihned přenesou do laboratoře k okamžitému zpracování.
3. Na Petriho misce s celým obsahem zkumavky se vzorek UZL rozmělní skalpelem, aby došlo k uvolnění buněk.
4. Rozmělněný vzorek UZL se pomocí pasteurovy pipety přenesou do plastové kultivační nádoby s kultivačním médiem.
5. Do nádoby se pak přidá 12  $\mu$ l colcemidu a kultivuje se v termostatu při 37 °C 24 hodin.
6. Následující den se materiál zpracovává (viz níže - kapitola 4.1.2).
7. Ze zbytku uzliny se v molekulárně biologické laboratoři izoluje DNA.

#### **4.1.2 Zpracování biologického materiálu**

1. Kultivovaný materiál se přenesse do 15ml centrifugačních zkumavek a centrifuguje 10 min při 37 °C a 1000 rpm.
2. Po centrifugaci se odebere supernatant a k peletu se přidá 10 - 12 ml 0,075M roztoku KCl na 25 min (inkubace při 37 °C).
3. Po 25 min se přidá 1 kapka fixačního roztoku, promíchá se a centrifuguje 10 minut při 1000 rpm a 37 °C.
4. Po centrifugaci se sleje supernatant a k peletu buněk se po kapkách přidá cca 1 ml ledově vychlazeného fixačního roztoku (kyselina octová: metanol, 1:3) a poté se fixací doplní zkumavky do 15 ml, promíchá se a materiál se nechá 30 min inkubovat při laboratorní teplotě (RT, room temperature).
5. Zkumavky s materiálem se dále centrifugují 10 min při 4 °C a 1000 rpm.
6. Pro vyčištění se buňky dále promývají fixačním roztokem: odsát supernatant, doplnit fixačním roztokem a opět centrifugovat, dokud nebude materiál čistý, mléčně bílý (proces se opakuje min. 5x).
7. Čistá suspenze buněk se uchovává v chladničce, popř. se zamrazuje na -20 °C.

#### **4.2 Konvenční cytogenetika**

##### **Příprava a barvení cytogenetických preparátů Giemsovým barvivem**

1. Skla se položí na barvicí mřížku, zakápnou se roztokem Giemsa (barvivo : destilovaná voda v poměru 1: 9) a nechá se působit 10 minut.
2. Sklo se opláchne destilovanou vodou a nechá se uschnout při RT.
3. Následuje mikroskopické hodnocení, které slouží k hodnocení úspěšnosti kultivace biologického materiálu (úspěšná/neúspěšná kultivace, popř. neúspěšný odběr) a rychlému posouzení mitóz (počet chromozómů a případná přítomnost abnormálních chromozómů). Tato metoda však není vhodná pro samotné karyotypování.

##### **Příprava a barvení cytogenetických preparátů G-pruhováním a karyotypování**

1. Na nadýchané sklo se z cca 50 cm nakape zpracovaný biologický materiál (cca 3 kapky; 5 skl pro každého pacienta a kultivaci).
2. Nakapaný materiál se protáhne nad kahanem a nechá se doschnout při RT.
3. 1 suché podložní sklo je vloženo do barvicího roztoku I na 2 min.

4. Po 2 min se opláchne v EBCS a vloží do barvicího roztoku II na 3 min.
5. Sklo se opláchne v destilované vodě, nechá se uschnout a pozoruje se ve světelném mikroskopu.
6. Pokud je obarvení vhodné pro karyotypování, stejným způsobem se připraví i další 4 skla, pokud vhodné není, upraví se délky inkubací v barvicích roztocích I a II.
7. Pomocí světelného mikroskopu se vyhledá a vyhodnotí cca 30 mitóz a za pomoci počítače a softwarového programu IKAROS se chromozómy sestaví do karyotypů.

### 4.3 Molekulární cytogenetika

#### 4.3.1 FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace)

1. Suspenze buněk se centrifuguje (10 min, 37 °C, 1000 rpm), odsaje se supernatant a doplní se čistým fixačním roztokem.
2. Opět se suspenze centrifuguje za stejných podmínek.
3. Po odsátí supernatantu doplníme čerstvou fixací tak, aby suspenze buněk měla světle mléčnou barvu.
4. Na nadýchané podložní sklo se nakape suspenze buněk z výšky cca 30 cm, nechá se usušit na desce s 45 °C a zkontroluje se správná hustota buněk na nakapaném podložním sklíčku.
5. Dále se sklo vloží do roztoku 2x SSC na 30 min při RT.
6. Mezitím se připraví sonda - příprava sondy se řídí doporučením výrobce (viz Tab VII, VIII, IX).
7. Poté se sklo odvodňuje se v alkoholové řadě (v 70%, 80%, 90% a 96% etanolu po 2 min).
8. Po usušení se sklo denaturuje při 73 °C v denaturačním roztoku po dobu 5 min (při použití lokus-specifických a centromerických sond, při použití celochromozómových - paintingových sond se sklo denaturuje pouze 2 min).
9. Po denuraci se sklo nesusí a rovnou se vkládá do 70% etanolu a opakuje se odvodňování v alkoholové řadě.
10. Následně se sklo nechá usušit.
11. Současně se denaturuje sonda – denaturace sondy se řídí návodem výrobce.
12. Na krycí sklo (22x22 mm) se pipetuje 8 µl příslušné sondy a aplikuje na sklo podložní s připravenou suspenzí buněk.

13. Okolo krycího skla se pak nanáší ruber cement pro udržení vlhkosti mezi skly.
14. Hybridizace pak probíhá ve vlhčené hybridizační komůrce 24 hod při teplotě 37 °C.
15. Další den se odstraní ruber cement a krycí sklo. Sklo s buňkami se promývá 2 min v 0,4x SSC + 0,3 % NP40 při 73 °C a dále v 2x SSC + 0,1 % NP40 při RT také 2 min.
16. Sklo se nechá usušit, aplikuje se na něj 10 µl DAPI, překryje se krycím sklem 24x24 mm a je připraveno k hodnocení.
17. Vyhodnocování probíhá pod fluorescenčním mikroskopem s fluorescenčními filtry propouštějícími fluorescenci příslušných fluoroforů použitých sond.
18. Obraz se dále snímá pomocí CCD kamery a ukládá v počítači pomocí programu ISIS.
19. Při hodnocení interfázních jader se zpravidla hodnotí 300 buněk, za patologický nález se považuje hodnota nad 5 % patologických buněk v preparátu (do 5 % - cut of level použité sondy).

**Tab VII:** Příprava lokus-specifických (LSI) sond firmy Abbott Molecular

Sonda	Ředění	Denaturace
LSI IgH	7 µl hybridizačního pufru 2 µl dest. H <sub>2</sub> O 1 µl sondy	5 min při 73 °C
LSI ATM/TP53	předpřipraveno	5 min při 73 °C
LSI Cep12/13q14(D13S319)/13q34	předpřipraveno	5 min při 73 °C

**Tab VIII:** Příprava lokus-specifických (LSI) sond firmy Kreatech

Sonda	Ředění	Denaturace
IgH	předpřipraveno	10 min při 90 °C
6q21/8q24	předpřipraveno	10 min při 90 °C

**Tab IX:** Příprava paintingových, celochromozómových (WCP) sond

Sonda	Ředění	Denaturace
6,5 µl sondy pro chr. 11 FITC	předpřipraveno	10 min při 73°C, 30 min. při 37°C
6,5 µl sondy pro chr. 14 Cy3	předpřipraveno	10 min při 73°C, 30 min. při 37°C

Většinou se používají 2 sondy rozdílného značení. Např. pro chromozóm 11 značení FITC a pro chromozóm 14 značení Cy3 nebo Spectrum Orange.

#### 4.3.2 M-FISH (multicolor FISH)

1. - 4. totožné s kroky 1 - 4 uvedené v předchozí kapitole 4.3.1 FISH.
5. Nakapaná skla se nechají 30 min v termostatu při 37 °C v zatemněné krabici na navlhčené gáze.
6. Rehydratace se provádí alkoholovou řadou, postupně přes 96%, 70%, 50% až 30% etanol (po 1 min).
7. Po rehydrataci se sklo nechá 1 min v roztoku 0,1x SSC při RT a dále se vkládá do roztoku 2x SSC na 30 min při teplotě 70 °C.
8. Po 30 min se z vodní lázně vytáhne koplínka se sklem a nechá se stát 20 min při RT.
9. Současně se v cycleru denaturuje už od výrobce předpřipravená sonda (podmínky denaturace se řídí návodem výrobce - viz Tab X).
10. Po 20 min v 2x SSC se sklo postupně po jedné minutě přemísťuje roztoky 0,1x SSC (RT), 0,07M NaOH (RT), 0,1x SSC (4 °C) a 2x SSC (4 °C).
11. Následuje odvodňování v etanolové řadě od 70%, přes 90% až do 96% etanolu (opět po 1 min).
12. Sklo se nechá uschnout, aplikuje se na něj zdenaturovaná sonda, překryje se krycím sklem (22x22 mm) a přes okraje se nanese ruber cement.
13. Hybridizace probíhá ve vlhčené hybridizační komůrce 24 - 48 hod.
14. Po hybridizaci se sklo promývá 2 min v roztoku 0,4x SSC při 73°C a následně v 2x SSC/Tween 30 sec při RT.
15. Sklo se usuší, nanese se na něj DAPI (10 µl) a překryje se krycím sklem (24x24 mm).

**Tab X:** Podmínky denaturace sondy pro M-FISH:

Teplota	Čas
75 °C	5 min
10 °C	30 sec
37 °C	30 min

#### **4.4 Použité přístroje**

CCD kamera

Centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA)

CO<sub>2</sub> inkubátor Function Line (Heraeus Holding, Hanau, Německo)

Digestoř

Flowbox HERAsafe® (Heraeus Holding, Hanau, Německo)

Fluorescenční lampa U-RFL-T (obojí Olympus, Tokyo, Japonsko)

Inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK)

Kahan

Karyotypovací software Ikaros (MetaSystems, Altlussheim, Německo)

Laboratorní sklo

Laboratorní váhy Scaltec (Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Německo)

Lednička

Magnetická míchačka (Schott Instruments, Mainz, Německo)

Metafer Axioplan 2 Imaging (MetaSystems, Altlussheim, Německo)

Mraznička

pH metr Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)

Pipety (Gilson, Middleton, WI, USA)

Skleněné kyvety

Software Axioplan 2 (Carl Zeiss MicroImaging, LLC, Thornwood, NY, USA)

Software ISIS (MetaSystems, Altlussheim, Německo)

Stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA)

Světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japonsko)

Topná a sušící deska Medax (Nagel, Kiel, Německo)

Třepačka Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)

Vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, Německo)



#### **4.5 Použitý spotřební materiál**

Centrifugační zkumavky Falcon (15ml), (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Centrifugační zkumavky Falcon (50 ml), (TPP®, Trasadingen, Švýcarsko)

Fixogum Rubber Cement (Marabu, Tamm, Německo)

Imerzní olej (Olympus, Tokyo, Japonsko)

Krycí skla (22x22 mm, 24x24 mm), (Menzel-Gläser, Braunschweig, Německo)

Parafilm® (Bemis Company, Neenah, WI, USA)

Pasteurovy pipety (10 ml), (Biosigma, Benátky, Itálie)

Plastové kultivační láhve (40 ml), (Nunclon TM Δ Surface, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Plastové mikrozukmavky (1,5 ml; 2 ml), (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Sterilní injekční jehly (B. Braun, Melsungen, Německo)

Špičky (Gilson, Middleton, WI, USA)

#### **4.6 Použité chemikálie**

0,075M KCl (lékárna FNOL)

20x SSC (saline-sodium citrate buffer)

70%, 80%, 90% a 96% etanol (Lékárna FNOL)

Antibiotic Antimycotic solution (ATB = penicilin, streptomycin, amphotericin), (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

BM médium (bone marrow karyotyping medium), (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael)

DAPI (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

d H<sub>2</sub>O (vyrábí si HOK)

EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) - oplachovací roztok (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Fluorescenčně značená sonda (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA; Kreotech, Amsterdam, Nizozemí)

Giemsa KaryoMAX (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Gurrův roztok (Gurr's buffer solution pH 6,8), (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Heparinum natricum (Zentiva, Praha, ČR)

Karyomax Colcemid (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Kyselina citronová (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Leishmann's stain (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Metanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

NP40 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

PBS pufr pH 7,4 (lékárna FNOL)

RPMI-1640 médium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Telecí sérum (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Trypsin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Tween20 (Serva, Heidelberg, Německo)

Ultračistý formamid (Qbiogene, Montreal, QC, Kanada)

#### **4.7 Použité roztoky**

##### **0,14M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:**

25 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O

500 ml dH<sub>2</sub>O

##### **0,1M kyselina citronová:**

10,5 g kys. citronové

500 ml dH<sub>2</sub>O

**0,4x SSC/0,3% NP40:**

20 ml 20x SSC

950 ml injekční H<sub>2</sub>O

3 ml NP40

pH 7 - 7,5

doplnit H<sub>2</sub>O do 1 l, uchovávat při RT

**20x SSC:**

132 g 20x SSC

500 ml dH<sub>2</sub>O

pH 7, uchovávat při RT

**2x SSC/0,1% NP40:**

100 ml 20x SSC

850 ml injekční H<sub>2</sub>O

1 ml NP40

pH 7 - 8

doplnit H<sub>2</sub>O do 1 l, uchovávat při RT

**2x SSC:**

zásobní roztok 20x SSC

dH<sub>2</sub>O

**Barvicí roztok I:**

75 ml 0,14M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

20 ml kyseliny citronové

0,32 ml Giemsa Karyomax

0,5 ml roztoku trypsinu v PBS

**Barvicí roztok II:**

15 ml Leishmannova činidla

45 ml Gurruova roztoku

**Denaturační roztok:**

2 ml 20x SSC,

4 ml injekční H<sub>2</sub>O

14 ml formamidu,

upravit pH na 7 - 8

**Leishmannovo činidlo:**

0,6 g Leishmann's stain

400 ml metanolu (rozpuštět na magnetické míchačce po dobu 4 hodin)

roztok do odměrné baňky a doplnit metanolem do objemu 500 ml

činidlo musí před prvním použitím 24 hodin zrát

**Roztok trypsinu:**

0,04 g trypsinu

1 ml PBS

## 5 Výsledky

### 5.1 Soubor nemocných

Od září 2011 do konce roku 2012 bylo celkem vyšetřeno 94 pacientů. U 80 nemocných byla imunofenotypizačním vyšetřením potvrzena diagnóza chronické lymfocytární leukémie, u zbývajících 14 nemocných byla prokázána jiná hematologická malignita. Z tohoto důvodu je těchto 14 nemocných hodnoceno odděleně, mimo soubor nemocných s B-CLL.

V souboru 80 nemocných s B-CLL bylo 20 žen (25 %) a 60 mužů (75 %), 46 nemocných (57,5 %) bylo vyšetřeno v době stanovení diagnózy onemocnění. U 34 nemocných (42,5 %) se jednalo o vyšetření kontrolní po léčbě onemocnění, u těchto nemocných byla k hodnocení nalezených chromozómových změn použita vstupní data z databáze cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoře Hemato-onkologické kliniky. U všech 80 nemocných jsou tedy uvedena data ze vstupních stážovacích vyšetření, u 34 nemocných, u kterých bylo provedeno i kontrolní vyšetření jsou uvedena data z obou vyšetření. Medián věku v době stanovení diagnózy byl 58 roků, s rozmezím 34 - 84 let.

**Tab XI:** Základní rozdělení pacientů dle pohlaví a věku.

Počet vyšetřených pacientů		80
Muži		60
Ženy		20
Věk při diagnóze	medián	58
	rozmezí	34 - 84

Průtoková cytometrie prokázala u všech 80 nemocných diagnózu B-CLL s expresí znaků CD19+, CD20+, CD23+, CD5+. Stanovení exprese ZAP-70 a CD38 flowcytometrickou analýzou bylo použito k určení prognózy onemocnění. Exprese ZAP-70 byla prokázána u 50 (92,6 %) z 54 vyšetřených a exprese CD38 u 31 (40,1 %) z 76 vyšetřených (viz Tab XII).

**Tab XII:** Shrnutí základních vyšetření u všech vyšetřených pacientů.

Číslo pac.	Pohlaví	Věk v době dg.	Binet	Mutační stav	Expresse ZAP 70	Expresse CD38
1.	M	49	A	nem	ND	neg
2.	F	71	A	mut	ND	neg
3.	M	56	B	mut	poz	neg
4.	M	70	C	nem	ND	neg
5.	M	41	B	nem	poz	poz
6.	M	53	B	nem	poz	neg
7.	M	67	B	nem	ND	poz
8.	M	53	A	mut	poz	neg
9.	M	54	B	nem	poz	poz
10.	M	83	B	ND	ND	ND
11.	M	62	C	nem	poz	poz
12.	F	60	A	mut	poz	neg
13.	M	69	A	nem	ND	neg
14.	F	59	A	nem	poz	neg
15.	M	50	B	mut	poz	poz
16.	F	48	B	nem	poz	neg
17.	M	76	A	nem	poz	neg
18.	F	66	A	mut	poz	neg
19.	M	57	A	nem	poz	neg
20.	M	58	B	mut*	poz	poz
21.	F	63	A	mut	neg	neg
22.	M	73	B	mut*	ND	poz
23.	M	39	A	mut	poz	neg
24.	F	66	C	mut	poz	neg
25.	M	36	B	nem	poz	neg
26.	M	56	B	mut	ND	neg
27.	F	58	A	mut*	poz	neg
28.	M	64	A	mut	ND	poz
29.	M	56	A	mut	poz	neg
30.	M	34	C	nem	poz	poz
31.	M	63	A	mut*	poz	neg
32.	F	62	A	mut	poz	poz
33.	M	44	B	nem	neg	neg
34.	M	73	C	nem	poz	ND
35.	M	59	?	nem	ND	neg

**Tab XII, pokračování:** Shrnutí základních vyšetření u všech vyšetřených pacientů.

Číslo pac.	Pohlaví	Věk v době dg.	Binet	Mutační stav	Expresse ZAP 70	Expresse CD38
36.	M	56	C	mut	poz	neg
37.	M	41	B	nem	poz	poz
38.	M	52	A	mut	poz	neg
39.	M	79	A	nem	ND	neg
40.	F	50	A	mut	poz	poz
41.	M	60	A	nem	ND	poz
42.	M	55	A	mut	poz	poz
43.	M	83	A	nem	poz	neg
44.	M	67	A	nem	poz	neg
45.	M	57	A	mut	ND	neg
46.	M	56	A	nem	ND	neg
47.	M	84	A	nem	poz	neg
48.	F	60	C	nem	poz	neg
49.	F	66	C	nem	poz	poz
50.	M	58	A	mut	poz	neg
51.	M	66	C	nem	poz/neg	neg
52.	F	55	A	mut	ND	neg
53.	M	52	B	mut	ND	poz
54.	F	46	C	nem	neg	neg
55.	F	70	B	nem	poz	poz
56.	M	60	C	nem	ND	poz
57.	M	52	B	ND	ND	ND
58.	M	48	B	nem	poz	neg
59.	M	57	B	nem	poz	poz
60.	F	74	A	nem	ND	ND
61.	M	50	A	mut	poz	neg
62.	M	50	A	nem	ND	poz
63.	M	56	A	nem	poz	poz
63.	M	53	B	mut	poz	neg
65.	M	60	B	nem	poz	poz
66.	M	43	C	nem	poz	neg
67.	M	49	A	ND	ND	neg
68.	M	49	C	mut	ND	poz
69.	M	57	C	nem	ND	poz
70.	M	50	C	nem	poz	poz

**Tab XII, pokračování:** Shrnutí základních vyšetření u všech vyšetřených pacientů.

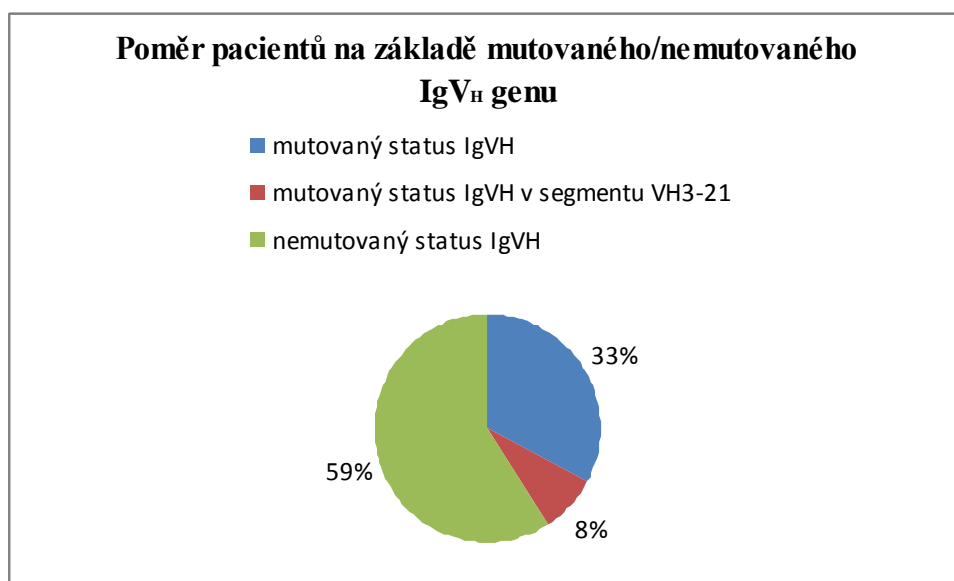
Číslo pac.	Pohlaví	Věk v době dg.	Binet	Mutační stav	Exprese ZAP 70	Exprese CD38
71.	F	68	C	nem	poz	poz
72.	M	66	A	ND	ND	poz
73.	M	61	B	nem	poz	poz
74.	M	70	A	mut	poz	neg
75.	M	64	?	mut*	poz	neg
76.	F	76	A	nem	poz	poz
77.	F	56	A	nem	poz	poz
78.	M	60	?	nem	ND	neg
79.	M	78	A	nem	poz	neg
80.	F	62	C	mut*	ND	poz

Legenda: F - female (žena), M - male (muž), N - normální, ND - not done (neprovedeno), mut - mutované IgVH, mut\* - mutované IgVH v segmentu VH3-21, nem - nemutované IgVH, poz - pozitivní, neg - negativní, poz/neg - hraniční hodnota (19 %)

Mutační stav IgVH byl vyšetřen metodami molekulární biologie u 76 nemocných, mutovaný stav IgVH byl prokázán u 31 nemocných (41 %), z toho 6 pacientů – č. 20, 22, 27, 31, 75, 80 - s mutací v segmentu VH3-21. Nemutovaný u 45 nemocných (59 %) (graf č. 1). 20 pacientů (44,4 %) z těchto 45 nemocných s nemutovaným stavem IgVH mělo pozitivní vyšetření na expresi CD38 (pacienti č. 5, 7, 9, 11, 30, 37, 41, 49, 55, 56, 59, 62, 63, 65, 69, 70, 71, 73, 76 a 77), u 2 pacientů (4,4 %) toto vyšetření nebylo provedeno, zbývajících 23 (51,1 %) pacientů bylo negativní na CD38 expresi.



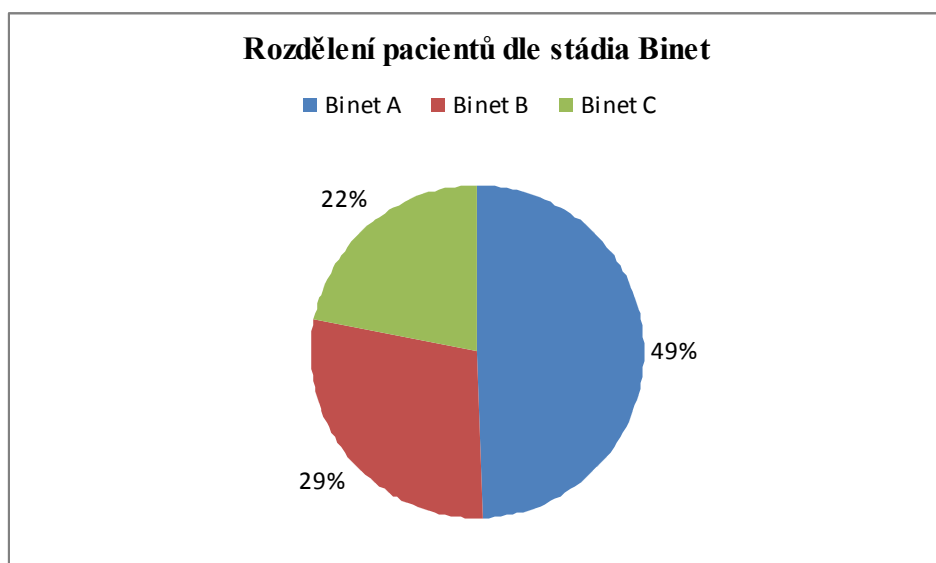
**Graf č. 1:** Poměr pacientů na základě mutovaného/nemutovaného IgVH genu.



Celkem 7 pacientů mělo dle výsledků FISH delecii TP53 genu (viz dále - kapitola Výsledky FISH 5.3, Tab XVII). 6 pacientů mělo zároveň nemutovaný IgVH status (pac. č. 1, 39, 48, 56, 62, 65) a 3 pacienti (č. 56, 62, 65) měli také CD38+ expresi, u jednoho pacienta s deletovaným TP53 (č. 10) nebyla tato vyšetření provedena.

Klinickému stádiu A dle Bineta odpovídalo 38 nemocných (49 %), stádiu B 22 nemocných (29 %) a stádiu C dle Bineta 17 nemocných (22 %), (graf č 2). U 3 nemocných nebylo stádium dle Bineta zhodnoceno.

**Graf č. 2:** Rozdělení pacientů dle stádia Binet.

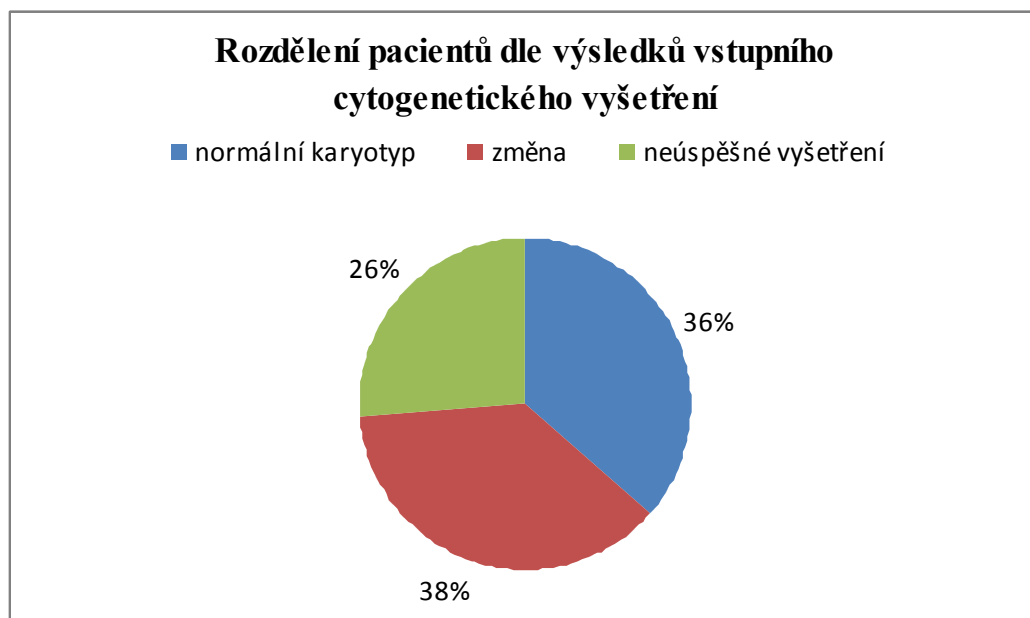


## 5.2 Výsledky cytogenetické analýzy

### 5.2.1. Nemocní vyšetření v době diagnózy onemocnění

Většina, 74 nemocných (92,5 %), byla vyšetřena z periferní krve a 4 nemocní z kostní dřeně. U 1 nemocné (č. 16) bylo vyšetření provedeno z PK i KD s tím, že kostní dřeň byla infiltrována patologickými B-lymfocyty na rozdíl od PK. 1 nemocný (č. 68) byl vyšetřen paralelně z KD i uzliny. Kostní dřeň nebyla infiltrována, avšak v uzlině byly nalezeny cytogenetické změny. Cytogenetické vyšetření bylo provedeno u všech 80 pacientů. U 21 pacientů (26 %) bylo vyšetření neúspěšné, 29 pacientů (36 %) mělo normální karyotyp a u 30 (38 %) pacientů byla prokázána chromozómová změna v karyotypu nemocného (viz Tab XIII, XIV a graf č. 3). Nejčastější změnou nalezenou pomocí konvenční cytogenetiky byl nález del(13q) a del(11q). Tab XIII uvádí výsledky vstupní cytogenetické analýzy u 46 nemocných a Tab XIV ukazuje srovnání výsledků 34 nemocných, u kterých bylo provedeno jak vstupní tak kontrolní cytogenetické vyšetření.

**Graf č. 3:** Rozdělení pacientů dle výsledků vstupního cytogenetického vyšetření.



**Tab XIII:** Přehled výsledků vstupního cytogenetického vyšetření.

Pac. č.	Pohlaví	Věk	Materiál	Cytogenetika
3	M	56	PK	46,XY[21]
5	M	41	PK	47,XY,+12[7]/ 46,XY[2]
6	M	53	PK	46,XY[22]
7	M	67	PK	46,XY[30]
8	M	53	PK	46,XY[10]
10	M	83	PK	41-45,X,-Y,-8,?der(11),der(12),del(13q),-15,der(17),-18,+1-3mar[cp14]
12	F	60	PK	46,XX[4]
13	M	69	PK	46,XY,del(13q)[6]/ 46,XY[4]
14	F	59	PK	46,XX[30]
15	M	50	PK	49,XY,+12,+18,+19[12]
17	M	76	PK	46,XY[5]
18	F	66	PK	UNS
22	M	73	PK	46,XY,del(11q)[23]/ 46,XY,?der(9),del(11q),del(13q)[5]
27	F	58	PK	46,XX[30]
32	F	62	PK	47,XX,del(13)(q14),+18[8]
34	M	73	PK	UNS
35	M	59	PK	UNS
36	M	56	PK	46,XY[6]
37	M	41	PK	46,XY,del(11q)[3]/ 46,XY[6]
39	M	79	PK	46,XY,t(2;11)(q?13;q?13),der(5)t(14;17;5)(q?13;q?21;p?13),?del(17)(p13) [8]/ 46,XY,t(11;1;X;11)(p?;p?;q?;p?),der(1)t(17;12;1)(?q;q?;q?),t(2;11)(q?13;q ?13),der(7)t(7;17)(q?;?q),?del(17)(p13)[8]
40	F	50	PK	UNS
41	M	60	PK	47,XY,t(6;8)(q?13;p?13)ins(6;8)(q?24;q?23q?24)ins(8;8)(p?;q?24),+12 [19]
42	M	55	PK	46,XY[13]
44	M	67	PK	UNS
47	M	84	PK	UNS
50	M	58	PK	UNS
55	F	70	PK	46,XX[11]
56	M	60	PK	43,X,-Y,?del(6q),der(7),add(8p),?der(9),add(11p),del(17p),-18,-20[cp10]/ 46,XY[1]
58	M	48	PK	45,XY,del(6q),?der(7),-9,-13,+mar,[cp8]
61	M		PK	46,XY[10]
62	M	50	PK	45,XY,del(13q),-16,del(17p)[12]
63	M	56	PK	UNS
65	M	60	PK	44-45,XY,?der(4),?der(7),-9,-10,der(11),-15,?der(17),?der(18),+1- 2mar[cp7]/ 46,XY[3]
67	M	50	PK	46,XY,?del(13q)[2]/ 46,XY[4]
68	M	49	PK	ND
			KD	46,XY[25]
			UZL	49,XY,+12,?+16,+19[cp3]/ 46,XY[8]
70	M	50	PK	46,XY,del(11q)[20]
71	F	68	PK	46,XX[5]

**Tab XIII, pokračování:** Přehled výsledků vstupního cytogenetického vyšetření.

<b>Pac. č.</b>	<b>Pohlaví</b>	<b>Věk</b>	<b>Materiál</b>	<b>Cytogenetika</b>
72	M	66	PK	46,XY[14]
73	M	61	PK	46,XY,del(11q)[11]/ 46,XY[4]
74	M	70	PK	46,XY[3]
75	M	64	PK	46,XY,del(11q)[12]/ 46,XY[2]
76	F	76	PK	46,XX[14]
77	F	56	PK	46,XX[30]
78	M	60	PK	46,XY,?del(7q),?del(11q)[13]/ 46,XY[3]
79	M	78	PK	UNS
80	F	62	PK	46,XX[30]

*Legenda: F - female (žena), M - male (muž), PK - refírení krev, KD - kostní dřeň, UZL - uzlina, ND - not done (neprovedeno), UNS - unsuccessful (neúspěšné)*

**Tab. XIV:** Přehled výsledků vstupního a kontrolního cytogenetického vyšetření

Pac. č.	pohlaví	Věk	Materiál	rok dg	dg. CY	Materiál kontrolního vyš.	K CY
1	M	49	PK	2005	UNS	KD	44,XY,+i(2)(p10),der(3)t(3;8)(?p;q?23),-8,del(13)(q14), der(13)del(13)(q14)?dic(13;17)(p11;p11),?dic(18;19)(?p11;q)[11]/ 43,XY,?der(1),-2,add(4)(?q35),-8,-8,add(12)(p?12),del(13)(q14), der(13)del(13)(q14)t(13;17)(p11;q11),-17,-22,+2mar[2]/ 46,XY[2]
2	F	71	PK	2010	46,XX[30]	PK	UNS
4	M	70	PK	2009	UNS	PK	47,XY,+12,t(14;18)[6]
9	M	54	KD	2000	46,XY,del(6q)[3]/ 46,XY,del(17p)?[2]/ 46,XY[22]	PK	44-46,XY,-12,?-15,-17,+2mar[cp9]/ 46,XY[2]
11	M	62	PK	2010	46,XY[30]	PK	46,XY[29]
16	F	48	PK	2007	46,XX[15]	PK	46,XX[17]
			KD		46,XX,?20q-[3]/ 46,XX[6]	KD	46,XX,?del(20q)[5]/ 45-46,XX,-17,?del(20q),+mar[3]/ 46,XX[2]
19	M	57	PK	2006	47-50,XY[cp6]/ 46,XY[4]	PK	46,XY,der(1),t(13;18)[14]/ 46,XY,der(1),del(11q),t(13;18)[3]
20	M	58	PK	2010	46,XY,del(11q),-22,+mar[10]/ 46,XY,del(11q)[3]	PK	46,XY,del(11q),der(22)[cp9]/ 44-46,XY,?der(1),der(4),del(11q),-13,-18,+1-2mar[cp12]
21	F	63	PK	2005	UNS	PK	UNS
23	M	39	PK	2004	UNS	PK	UNS
24	F	66	PK	2008	49,XX,+3mar[2]/ 46,XX [29]	PK	46,XX,ins(10;17)[10]
25	M	36	KD	2005	46,XY[19]	PK	46,XY[5]/ 45,XY,add(4q),add(11p),-17[3]
26	M	56	PK	2006	UNS	PK	UNS
28	M	64	KD	1998	46,XY[10]	KD	46,XY[26]
29	M	56	PK	2009	46,XY[10]	PK	47,XY,+mar[5]/ 46,XY[7]
30	M	34	PK	2007	UNS	PK	46,XY,der(11)t(2;11)[4]/ 46,XY[3]

**Tab. XIV, pokračování:** Přehled výsledků vstupního a kontrolního cytogenetického vyšetření

Pac. č.	pohlaví	Věk	Materiál	rok dg	dg. CY	Materiál kontrolního vyš.	K CY
31	M	63	KD	1997	46,XY,inv(9)(q12p11)[20]	PK	UNS
33	M	44	PK	2006	46,XY[6]	PK	46,XY[15]
38	M	52	PK	2003	UNS	PK	UNS
43	M	83	PK	2007	46,XY,del(6q),del(11q)[26]/ 47,XY,?der(7),-17,+2mar[8]	PK	46,XY,del(6q),del(11q)[15]/ 46,XY,?der(2),del(6q),del(11q)[3]/ 47,XY,t(7;17),+8[2]
45	M	57	PK	2004	UNS	PK	UNS
46	M	56	PK	2005	UNS	PK	UNS
48	F	60	PK	2007	45-46,X,-X,del(13q),del(17p),+mar[cp4]/ 46,XX,del(13q),del(17p)[3]	PK	46,XX,del(13q),del(17p)[18]
49	F	66	PK	2010	46,XX,del(6q)[7]/ 46,XX[9]	PK	46,XX,del(6q),?del(11q)[3]/ 46,XX[6]
51	M	66	PK	2007	UNS	PK	46,XY,der(7),der(14)[14]/ 46,XY[1]
52	F	55	PK	2002	46,XX [4]	PK	ND
53	M	52	PK	2002	46,XY[10]	PK	46,XY,?del(13)[6]/ 46,XY[9]
54	F	46	PK	2004	UNS	PK	46,XX,?der(5),?der(9),der(13),der(18)[6]/ 46,XX[9]
57	M	52	PK	2003	UNS	KD	UNS
59	M	57	PK	2010	46,XY,del(11q)[13]/ 46,XY[2]	PK	46,XY,del(11q)[4]
60	F	74	PK	2005	46,XX[3]	PK	UNS
64	M	53	PK	2007	46,XY [16]	PK	UNS
66	M	43	PK	2005	46,XY [25]	PK	46,XY,?add(3p),?der(4),?der(9)[16]/ 46,XY,?der(4),?der(9),?der(13),?der(17)[2]/ 46,XY[1]
69	M	57	PK	2010	45,X,-Y,?i(8q),del(11q),-18,+mar[12]/ 42-45,X,-Y,add(1p),der(4),?der(6),?i(8q), del(11q),-18,+mar[cp3]	PK	45,X,i(8),del(11q),-13,der(14),der(18)t(2;18)[5]/ 46,XY,i(8),del(11q),der(14),der(18)t(2;18)[5]/ 45,X,-Y,del(11q)[2]

Legenda: F - female (žena), M - male (muž), ND - not done (neprovedeno), UNS - unsuccessful (neúspěšně), PK - refírení krev, KD - kostní dřeň, UZL - uzlina

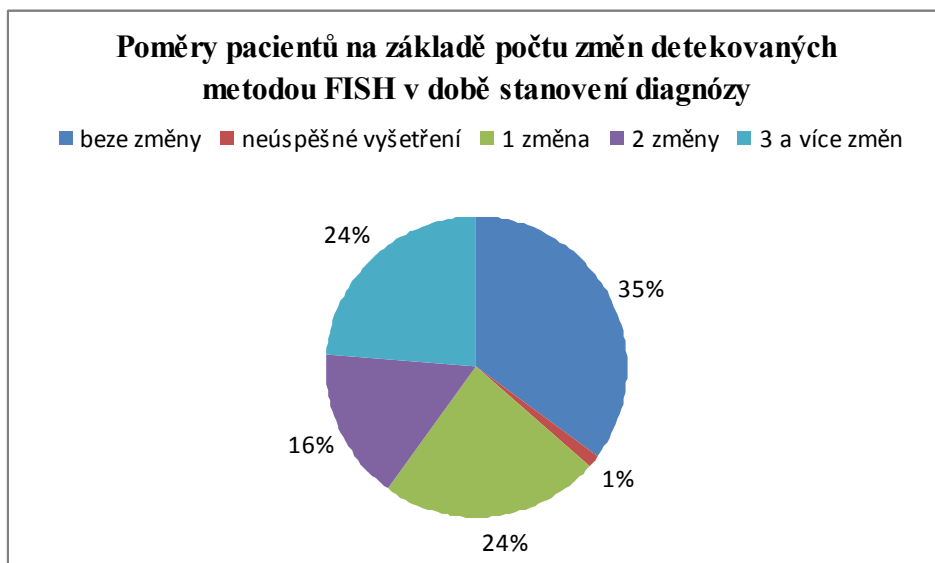
### 5.3 Výsledky FISH

Metodou FISH byli vyšetřeni všichni pacienti. U 1 pacienta bylo vyšetření neúspěšné a nebylo tedy možné výsledky vyhodnotit. Ze zbývajících 79 pacientů mělo 28 pacientů (35 %) vyšetření bez nálezů chromozómových aberací, u 51 pacientů (64 %) byla chromozómová změna nalezena. U 19 pacientů (24 %) byla potvrzena 1 změna, u 13 pacientů (16 %) 2 změny a 19 nemocných (24 %) mělo 3 a více změn – komplexní změny (shrnutí v tabulce XV a grafu č. 4).

**Tab XV:** Počty nalezených genetických změn detekovaných metodou FISH v době stanovení diagnózy

	počet pacientů	%
beze změny	28	35
1 změna	19	24
2 změny	13	16
3 a více změn	19	24
neúspěšné vyšetření	1	1

**Graf č. 4:** Počty nalezených genetických změn detekovaných metodou FISH v době stanovení diagnózy

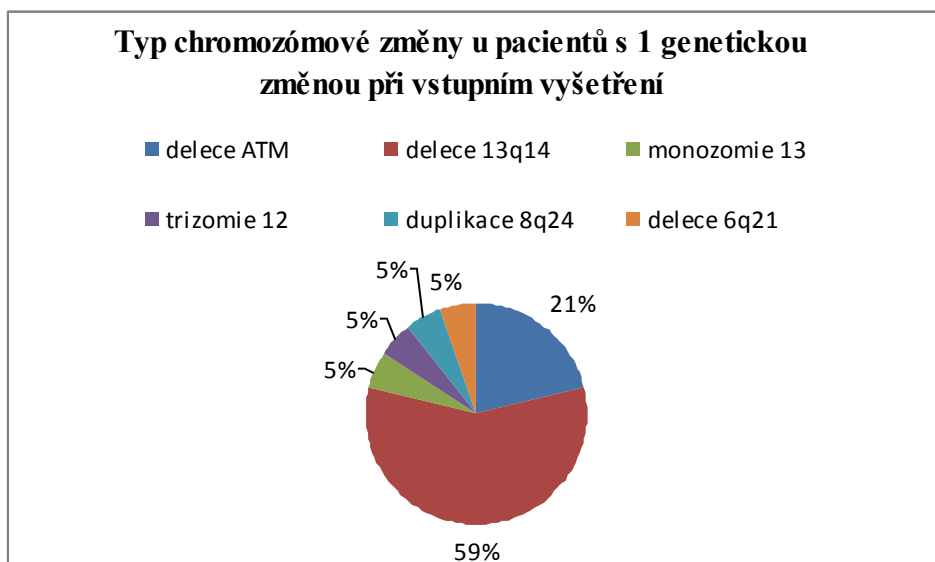


Pacienti (19), u kterých byla detekována jedna chromozómová změna, měli nejčastěji delecí 13q14 - 11 pacientů (59 %). Další změnou byla delece ATM u 4 pacientů (21 %) a dále trizomie chromozómu 12, monozomie 13, duplikace 8q24 (MYC) a delece 6q21 se vyskytovala vždy u jednoho pacienta (5 %), shrnutí viz tabulka XVI a graf č. 5.

**Tab XVI:** Typ chromozómové změny u pacientů s 1 genetickou změnou při vstupním vyšetření

Změna	počet pacientů	%
delece 13q14	11	59
delece ATM	4	21
trizomie 12	1	5
delece 6q21	1	5
monozomie 13	1	5
duplikace 8q24	1	5

**Graf č. 5:** Typ chromozómové změny u pacientů s 1 genetickou změnou při vstupním vyšetření





Klasickým panelem sond k detekci chromozómových změn u pacientů s B-CLL je sonda pro TP53, ATM, IgH, 13q14, kontrolní 13q34, centromeru 12, 6q21 a 8q24. Výsledky vyšetření metodou FISH s těmito sondami u jednotlivých pacientů při vstupním vyšetření shrnuje tabulka XVII.

**Tab XVII:** Přehled nalezených změn pomocí metody FISH u jednotlivých pacientů (hodnoty uvedeny v %).

Č. pac.	Pohlaví	Věk	Materiál	rok dg	Rok vstupního vyšetření	ATM	p53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	Další
1.	M	49	PK	2005	2005	N	93	93	N	N	N	ND	88	dup/trp
2.	F	71	PK	2010	2010	N	N	50/25	N	N	N	N	ND	
3.	M	56	PK	2011	2011	N	N	N	N	N	N	N	ND	
4.	M	70	PK	2009	2009	N	N	N	70	86	N	ND	ND	
5.	M	41	PK	2011	2011	N	N	N	63	78 FD	N	N	ND	
6.	M	53	PK	2011	2011	N	N	N	N	64 FD	N	N	ND	
7.	M	67	PK	2008	2012	N	N	N	N	N	N	N	ND	
8.	M	53	PK	2011	2011	N	N	N	N	N	N	N	ND	
9.	M	54	PK	2000	2000	N	N	N	N	N	N	57	ND	
10.	M	83	PK	2011	2011	N	65	40	N	N	N	38	N	
11.	M	62	PK	2006	2006	N	N	91	N	N	N	N	ND	
12.	F	60	PK	2008	2011	N	N	N	N	N	N	N	ND	
13.	M	69	PK	2011	2011	N	N	72**	N	N	N	N	ND	
14.	F	59	PK	2011	2011	N	N	N	N	69 FD	N	N	ND	
15.	M	50	PK	2011	2011	N	N	N	44	N	N	N	ND	+12,+18,+19
16.	F	48	PK	2007	2011	N	N	74	N	N	N	N	ND	del(20)(q12)
17.	M	76	PK	2011	2011	N	N	54	N	N	N	N	ND	

**Tab XVII, pokračování:** Přehled nalezených změn pomocí metody FISH u jednotlivých pacientů (hodnoty uvedeny v %).

Č. pac.	Pohlaví	Věk	Materiál	rok dg	Rok vstupního vyšetření	ATM	p53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	Další
18.	F	66	PK	2011	2011	N	N	16/66	N	80 FD	N	N	ND	
19.	M	57	PK	2006	2006	N	N	93	N	ND	ND	ND	ND	
20.	M	58	PK	2008	2008	96	N	10	N	N	N	N	ND	komplexní změny
21.	F	63	PK	2005	2005	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND	
22.	M	73	PK	2011	2011	82	N	48/31	N	N	N	N	ND	der(9)
23.	M	39	PK	2004	2005	ND	ND	51	ND	ND	ND	ND	ND	
24.	F	66	PK	2008	2008	N	N	N	N	95 FD	N	ND	ND	
25.	M	36	PK	2005	2005	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND	
26.	M	56	PK	2006	2006	N	N	86	N	ND	ND	ND	ND	
27.	F	58	PK	2012	2012	N	N	41	N	N	N	N	ND	
28.	M	64	PK	1998	1998	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND	ND	
29.	M	56	PK	2009	2009	N	N	28	N	N	N	N	ND	
30.	M	34	PK	2007	2007	96	N	97	N	N	N	ND	95	del(11)(q23)
31.	M	63	PK	1998	1995	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
32.	F	62	PK	2012	2012	N	N	15	N	N	N	N	ND	+18
33.	M	44	PK	2006	2007	N	N	39	N	N	ND	ND	ND	
34.	M	73	PK	2012	2012	N	N	N	N	64 FD	N	N	ND	
35.	M	59	PK	2008	2012	N	N	N	N	N	N	N	ND	
36.	M	56	PK	2011	2012	N	N	93	N	N	N	N	ND	
37.	M	41	PK	2012	2012	55	N	66	N	63 FD	N	N	ND	
38.	M	52	PK	2003	2003	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND	

**Tab XVII, pokračování:** Přehled nalezených změn pomocí metody FISH u jednotlivých pacientů (hodnoty uvedeny v %).

Č. pac.	Pohlaví	Věk	Materiál	rok dg	Rok vstupního vyšetření	ATM	p53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	Další
39.	M	79	PK	2012	2012	N	73	N	N	N	N	36	N	komplexní změny
40.	F	50	PK	2012	2012	N	N	N	N	N	N	N	ND	
41.	M	60	PK	2012	2012	N	N	N	76	N	N	76 del 3' konce	ND	komplexní změny
42.	M	55	PK	2012	2012	N	N	N	N	46 FD	N	N	ND	
43.	M	83	PK	2007	2011	38	N	66	N	N	25	34	ND	komplexní změny
44.	M	67	PK	2012	2012	N	N	N	68	N	72	N	ND	
45.	M	57	PK	2004	2004	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND	
46.	M	56	PK	2005	2005	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND	
47.	M	84	PK	2012	2012	N	N	N	N	N	N	N	ND	
48.	F	60	PK	2007	2010	N	72	66	N	N	N	78	ND	
49.	F	66	PK	2010	2010	N	N	N	N	N	13	N	ND	
50.	M	58	PK	2012	2012	N	N	40	N	N	N	N	ND	
51.	M	66	PK	2007	2007	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND	
52.	F	55	PK	2002	2002	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND	
53.	M	52	PK	2002	2002	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
54.	F	46	PK	2004	2004	N	N	11	N	ND	ND	ND	ND	
55.	F	70	PK	2012	2012	N	N	N	N	96 FD	N	N	ND	
56.	M	60	PK	2012	2012	N	89	31	N	N	N	77	N	komplexní změny
57.	M	52	PK	2003	2003	N	N	ND	N	ND	ND	ND	ND	

**Tab XVII, pokračování:** Přehled nalezených změn pomocí metody FISH u jednotlivých pacientů (hodnoty uvedeny v %).

Č. pac.	Pohlaví	Věk	Materiál	rok dg	Rok vstupního vyšetření	ATM	p53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	Další
58.	M	48	PK	2012	2012	N	N	N	N	83 FD*	83	N	ND	komplexní změny
59.	M	57	PK	2010	2010	55	N	73	N	N	N	N	ND	
60.	F	74	PK	2005	2005	66	N	N	N	ND	ND	ND	ND	
61.	M	50	PK	2012	2012	N	N	N	N	N	N	N	ND	
62.	M	50	PK	2003	2012	N	81	93	N	ND	ND	N	ND	dic(4;16)
63.	M	56	PK	2012	2012	89	N	82	N	N	N	N	ND	
64.	M	53	PK	2007	2007	N	N	N	N	N	N	ND	ND	
65.	M	60	PK	2011	2011	46	46	N	N	N	N	N	ND	komplexní změny
66.	M	43	PK	2005	2005	N	N	N	N	ND	ND	ND	ND	
67.	M	49	PK	2012	2012	N	N	27	N	N	N	N	ND	
68.	M	49	PK	2012	2012	N	N	1. klon: 0/46 2. klon: 0/17	1. klon: 46 2. klon: 0	N	N	N	ND	+12, ?+16,+19
69.	M	57	PK	2010	2010	81	N	N	N	N	N	50	84	del(9)(p21), komplexní změny
70.	M	50	PK	2012	2012	80	N	N	N	N	N	N	N	
71.	F	68	PK	2005	2012	N	N	10/64	N	74 FD	N	N	ND	komplexní změny
72.	M	66	PK	2004	2012	N	N	16/70	N	N	N	N	ND	
73.	M	61	PK	2010	2012	33	N	N	N	31 FD	N	N	ND	
74.	M	70	PK	2012	2012	N	N	N	N	N	N	N	ND	
75.	M	64	PK	2012	2012	73	N	N	N	N	N	N	ND	
76.	F	76	PK	2012	2012	N	N	N	N	N	N	N	ND	

**Tab XVII, pokračování:** Přehled nalezených změn pomocí metody FISH u jednotlivých pacientů (hodnoty uvedeny v %).

Č. pac.	Pohlaví	Věk	Materiál	rok dg	Rok vstupního vyšetření	ATM	p53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	Další
77.	F	56	PK	2012	2012	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	UNS	ND	
78.	M	60	PK	2012	2012	50	N	N	N	N	N	N	ND	del(7)(q31)
79.	M	78	PK	2012	2012	23	N	67	N	N	N	N	ND	
80.	F	62	PK	2011	2011	N	N	64	N	12	N	N	N	t(2;14)

*Legenda: F - female (žena), M - male (muž), N - normální, ND - not done (neprovedeno), UNS - unsuccessful (neúspěšné), FD - fyziologická delece, dup - duplikace, trp - triplikace, \*\* - monozomie, \* - bialecká delece IgVH*

### **Delece TP53**

Na deleci TP53 bylo vyšetřeno 78 pacientů, u 1 pacienta (1 %) bylo vyšetření neúspěšné a u 7 (9 %) byla prokázána delece TP53. U žádného nemocného se delece nevyskytovala jako samostatná chromozómová změna. 1 nemocný č. 62 měl kromě TP53 deleci 13q14 a byla u něj prokázána přítomnost dicentrického chromozómu dic(4;16), u 3 nemocných (pac. č. 10, 48, 56) byla kromě delece TP53 prokázána delece 13q14 a duplikace 8q24. U nemocného č. 1 byla kromě delece TP53 prokázána delece 13q14 a duplikace 2p. U nemocného č. 39 byl prokázán nález delece TP53 současně s duplikací 8q24, u nemocného č. 65 se vyskytovala delece TP53 současně s monozomií 15 a delecí ATM. Nález delece ATM současně s TP53 je neobvyklý a svědčí o pokročilém stádiu onemocnění a je spojen s nepříznivou prognózou onemocnění.

### **Delece ATM**

Delece ATM byla vyšetřena u 77 nemocných, u 1 nemocné (1 %) bylo vyšetření neúspěšné. Delece byla prokázána u 16 nemocných (21 %), u 4 nemocných (5 %) byla delece prokázána jako samostatná chromozómová změna. U pacientů s delecí ATM se další jako chromozómová změna prokázána metodou FISH vyskytovala delece 13q14 (8 nemocných). U nemocného č. 43 byly metodou FISH prokázány 4 aberace (delece ATM, 13q14, 6q21 a duplikace 8q24). U nemocného č. 69 byla kromě delece ATM prokázána duplikace 8q24, duplikace 2p a delece 9p21. Byl u něj také prokázán nález der(18)t(2;18). U nemocného č. 30 byla současně s delecí ATM prokázána delece 13q14 a duplikace 2p, která souvisí s der(11)t(2;11). U pacienta č. 78 se vyskytovala kromě delece ATM také del(7)(q31).

### **Delece 13q14**

Vyšetření na deleci 13q14 nebylo provedeno u 3 nemocných a neúspěšná byla u 1 pacienta (1 %). Delece 13q14 byla prokázána u 35 nemocných (45,5 %), u 28 pacientů se jednalo o monoalelickou deleci 13q14 (36 %), u 5 pacientů (6 %) se jednalo o výskyt monoalelické a bialelické delece a u 1 nemocného (č. 68), (1 %) byla prokázána bialelická delece ve dvou klonech (1. jako samostatná změna a 2. klon společně s trizomií 12). U 1 nemocného č. 13 (1 %) byla prokázána monozomie chromozómu 13.

### **Trizomie 12**

U tří pacientů nebylo vyšetření provedeno, u 1 pacienta bylo vyšetření neúspěšné (1 %). Normální nález byl prokázán u 70 nemocných (91 %) a trizomie 12 byla prokázána u 6 nemocných (8 %). Jako samostatná změna byla trizomie 12 prokázána pouze u pacienta č. 5. U 2 pacientů (č. 15 a 68) se trizomie 12 vyskytovala současně s trizomií 19. Trizomie 12 nebyla ani u jednoho pacienta prokázána současně s delecí ATM nebo delecí TP53.

### **IgH**

Nebylo vyšetřeno u 18 pacientů, neúspěšné u 1 pacienta (1,6 %), normální nález byl prokázán u 47 pacientů (76 %). Přestavba IgH byla prokázána u 2 nemocných (pac. č. 4, 80), (3 %). Fyziologická delece (delece 5'konce genu - variabilního řetězce) IgVH byla prokázána u 11 nemocných (18 %), z toho u jednoho nemocného (č.58) byla prokázána bialelická delece IgVH. U 6 z nich byla prokázána ještě jiná chromozómová změna - pac. č. 5, 18, 37, 58, 71, 73.

### **6q21**

Nebylo vyšetřeno u 19 nemocných, normální nález byl prokázán u 56 nemocných (92 %) a delece byla prokázána u 4 nemocných (pac. č. 49, 43, 44, 58), (6,5 %). A vždy se tato aberace nacházela současně s jinou chromozómovou změnou (pac. č. 49 měl delecí ATM v 6 % hodnocených buněk - cut of level - v Tab XVII neuvedeno).

### **8q24**

Vyšetření nebylo provedeno u 23 nemocných, neúspěšné bylo u 1 pacienta (1,7 %), normální nález byl prokázán u 48 nemocných (84 %). Duplikace byla prokázána u 7 nemocných (pac. č. 9, 10, 39, 43, 48, 56, 69), (13 %) a u 1 nemocného č. 41 (1,7 %) byla prokázána parciální delece 3'MYC. U všech nemocných byly s duplikací 8q24 prokázány další chromozómové změny, pouze jeden nemocný měl prokázanou jen duplikaci 8q24, avšak v době progresu onemocnění byly nalezeny i další chromozómové změny.

## **2p**

Vyšetření na duplikaci 2p bylo provedeno pouze u 8 nemocných (1 %), u kterých byly prokázány změny cytogenetickým vyšetřením. Z toho byl u 4 nemocných prokázán normální nález, u 1 nemocného byla prokázána translokace t(2;14) bez zmnožení materiálu chromozómu 2 (pac. č. 80) a u 3 nemocných byla prokázána duplikace, příp. triplikace 2p (pac. 1, 30, 69).

## **Komplexní změny**

Komplexní přestavby karyotypu byly prokázány při vstupním cytogenetickém vyšetření u 9 nemocných (20, 39, 41, 43, 56, 58, 65, 69 a 71). Tři z těchto nemocných (č. 20, 43 a 69) měli kontrolní cytogenetické vyšetření a u všech 3 byly opět prokázány komplexní přestavby karyotypu. U nemocného č. 20 byla metodou FISH prokázána jumping translokace - genetický materiál z chromozómu 2 byl translokován na různé chromozómy v každé mitóze jiné – chromozóm Y, 3, 8, 16, 20, 21, 22 (viz Tab XIX, XX).



**Tab XVIII:** Přehled nalezených změn pomocí metody FISH u pacientů při kontrolním vyšetření (hodnoty uvedeny v %).

Č. pac.	Pohlaví	Věk	Materiál	rok vyšetření	rok dg	Delece ATM	Delece TP53	Delece 13q14 (monoal./bial.)	Trizomie 12	Přestavba IgH	Delece 6q21	Duplikace 8q24	2p+	Další
1.	M	49	KD	2011	2005	ND	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	komplexní změny
2.	F	71	PK	2011	2010	N	N	50/25	N	N	N	N	ND	
4.	M	70	PK	2011	2009	N	N	N	N	54	N	N	ND	
9.	M	54	PK	2011	2000	N	N	ND	ND	ND	N	84	ND	komplexní změny
11.	M	62	PK	2011	2010	N	N	81	N	N	N	N	ND	
16.	F	48	PK	2012	2007	N	15	94	N	N	N	N	ND	del(20)
19.	M	57	PK	2011	2006	25	N	71	N	ND	ND	ND	ND	
20.	M	58	PK	2011	2010	98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	44	komplexní změny
21.	F	63	PK	2011	2005	N	N	48	N	N	N	N	ND	
23.	M	39	PK	2012	2004	ND	ND	42/44	N	ND	ND	ND	ND	
24.	F	66	PK	2012	2008	N	N	ND	ND	ND	N	N	ND	ins(10;17)
25.	M	36	PK	2012	2005	N	28	N	N	42 FD	N	25	ND	-17
26.	M	56	PK	2012	2006	ND	72	57	ND	ND	ND	78	ND	
28.	M	64	PK	2012	1998	N	N	18	N	27 FD	N	N	ND	
29.	M	56	PK	2012	2009	N	N	24/9	22	N	N	N	ND	+21
30.	M	34	PK	2012	2007	82	N	ND	ND	ND	ND	ND	81	der(11)t(2;11)
31.	M	63	PK	2012	1997	ND	ND	90/6	ND	ND	ND	ND	ND	inv(9)
33.	M	44	PK	2012	2006	20	N	18	N	N	N	N	ND	
38.	M	52	PK	2012	2003	N	N	N	N	N	N	N	ND	
43.	M	83	PK	2012	2007	52	N	76	N	N	45	39	ND	komplexní změny
45.	M	57	PK	2012	2004	N	12	12/74	N	N	N	N	ND	

**Tab XVIII, pokračování:** Přehled nalezených změn pomocí metody FISH u pacientů při kontrolním vyšetření (hodnoty uvedeny v %).

Č. pac.	Pohlaví	Věk	Materiál	rok vyšetření	rok dg	Delece ATM	Delece TP53	Delece 13q14 (monoal./bial.)	Trizomie 12	Přestavba IgH	Delece 6q21	Duplikace 8q24	2p+	Další
46.	M	56	PK	2012	2005	N	N	N	N	N	N	N	ND	
48.	F	60	PK	2012	2007	N	79	59/38	N	63 FD	N	80	ND	
49.	F	66	PK	2012	2010	5	N	N	N	N	14	N	ND	
51.	M	66	PK	2012	2007	N	N	N	N	N	N	N	N	t(7;14)
52.	F	55	PK	2012	2002	N	N	30	N	N	N	N	ND	
53.	M	52	PK	2012	2002	N	N	66	N	N	UNS	UNS	N	
54.	F	46	PK	2012	2004	N	N	39	N	N	N	N	N	komplexní změny
57.	M	52	PK	2012	2003	N	N	0/93	N	N	N	N	ND	
59.	M	57	PK	2012	2010	46	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-Y
60.	F	74	PK	2012	2005	90	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
64.	M	53	PK	2012	2007	N	N	10/70	N	N	N	N	ND	
66.	M	43	PK	2012	2005	N	82	N	N	N	N	N	ND	komplexní změny
69.	M	57	PK	2012	2010	53	N	N	N	N	N	53	ND	komplexní změny

Legenda: F - female (žena), M - male (muž), N - normální, ND - not done (neprovedeno), UNS - unsuccessful (neúspěšně), \* - bialelická delece

**Tab XIX:** Genetické změny detekované pomocí metod molekulární cytogenetiky (u pacientů s komplexními změnami v karyotypu - při stanovení diagnózy).

Pac. č.	pohlaví	ročník	Vyšetření FISH při stanovení diagnózy	Zjištěný karyotyp pomocí FISH
1	M	1955	del 13q14 (93 %) del TP53 (93 %) dup/trp NMYC(88 %)	nebyly nalezeny mitózy
9	M	1945	dup MYC (57 %)	N
20	M	1950	del ATM (96 %) del 13q14 (10 %)  dup 2p (56 %)	jumping translokace: 46,XY[5]/ 46,XY,der(22)t(2;22)(p?;p13)[6]/ 46,XY,der(20)t(2;20)(p?;?) [1]/ 46,XY,der(8)t(2;8)(p?;p?) [2]/ 46,XY,der(3)t(2;3)(p?;?) [1]/ 46,XY,der(16)t(2;16)(p?;?) [1]/ 46,XY,der(21)t(2;21)(p?;p13) [1]/ 46,XY,der(Y)t(2;Y)(p?;p?) [1]/ 46,XY,der(8)t(2;8)(p?;p?),?dic(12;22),der(19)t(1;19)(?;?),+mar[1]
39	M	1933	del TP53 (73 %) dup MYC (36 %)	46,XY,t(2;11)(q?13;q?13),der(5)t(14;17;5)(q?13;q?21;p?13),?del(17)(p13)[8]/ 46,XY,t(11;1;X;11)(p?;p?;q?;p?),der(1)t(17;12;1)(?q;q?q?),t(2;11)(q?13;q?13),der(7)t(7;17)(q?;?) ,?del(17)(p13)[8]
41	M	1950	triz 12 (76 %)  del 3' konce MYC (76 %)	47,XY,t(6;8)(q?13;p?13)ins(6;8)(q?24;q?23q?24)ins(8;8)(p?;q?24),+12[19]
43	M	1924	del ATM (38 %) del 13q14 (66 %) del 6q21 (25 %) dup 8q24 (34 %)	46,XY,del(6)(q21),del(11q)[26]/ 47,XY,del(6)(q21),t(7;17)(p?22;q?22)+8,del(11)(q22.4),der(?)ins(?;13)(?;q?32)del(13)(q14)[8]
54	F	1958	del 13q14 (11 %)	N
56	M	1952	del TP53 (89 %) del 13q14 (31 %) del 8q24 (77 %)	44,XY,der(X)t(X;8)(?;q24),der(6)t(6;7)(p?24;q?21)ins(6;Y)(p?24;q?11),-7,dic(17;18)(p?11;p?11),der(20)t(7;20)(?;q?23)[8]/ 43,XY,der(X)t(X;8)(?;q24),der(6)t(6;7)(p?24;q?21)ins(6;Y)(p?24;q?11),-7,?dic(15;22)(p?11;p?11),dic(17;18)(p?11;p?11), der(20)t(7;20)(?;q?23)[2]

**Tab XIX, pokračování:** Genetické změny detekované pomocí metod molekulární cytogenetiky (u pacientů s komplexními změnami v karyotypu - při stanovení diagnózy).

<b>Pac. č.</b>	<b>pohlaví</b>	<b>ročník</b>	<b>Vyšetření FISH při stanovení diagnózy</b>	<b>Zjištěný karyotyp pomocí FISH</b>
58	M	1964	bial. del IgH (83 %) del 6q21 (83 %)	45,XY,-6,der(13)t(6;13)(p?12;p?11)
65	M	1951	del TP53 (46 %) del ATM (46 %) -15 (67 %)	44,XY,der(4)t(15;10;9;4)(q22.32;q?11;p?14)del(4)(p16.3p15.1),-8,del(11)(q21q24.2),-15,del(17)(p13.3p11.2),t(17;20)(q21.31q23.1;?p)del(20)(p13p12.2)del(20)(p12.1),dup(20)(p12.2p12.1)dup(20)(p11.23p11.22),der(21)t(8;21)(?:?p)[9]/44,XY,der(4)t(15;10;9;4)(q22.32;q?11;p?14)del(4)(p16.3p15.1),-8,del(11)(q21q24.2),-15,del(17)(p13.3p11.2),t(17;20)(q21.31q23.1;?p)del(20)(p13p12.2)del(20)(p12.1),dup(20)(p12.2p12.1)dup(20)(p11.23p11.22)[8]/46,XY[3]
66	M	1962	N	N
69	M	1953	del 9p21 (48 %) dup 8q24 (50 %) del ATM (81 %) dup 2p (84 %)	45,X,-Y,i(8)(q10),del(9)(p21),del(11)(q22),der(18)t(2;18)(p?11;p11)[6]/46,XY,i(8)(q10),del(9)(p21),del(11)(q22),der(18)t(2;18)(p?11;p11)[2]/46,XY[18]
71	F	1937	monoal./bial. del 13q14 (10 %/64 %)	46,XX,t(1;16;15)(p?21;q?23;q?25) 46,XX,der(1)t(1;13)(q?36;q?33),t(13;17)(q?13;q:12)

**Tab XX:** Genetické změny detekované pomocí metod molekulární cytogenetiky (u pacientů s komplexními změnami v karyotypu - při kontrole).

Pac. č.	pohlaví	ročník	kontrolní vyšetření FISH	Zjištěný karyotyp pomocí FISH
1	M	1955	del ATM (98 %) del 13q14 (12 %) dup 2p (44 %)	44,XY,+i(2)(p10),der(3)t(3;8)(?p;q?23),-8,del(13)(q14),der(13)del(13)(q14)?dic(13;17)(p11;p11),?dic(18;19)(?p11;q)[11]/ 43,XY,?der(1),-2,add(4)(?q35),-8,-8,add(12)(p?12),del(13)(q14),der(13)del(13)(q14)t(13;17)(p11;q11),-17,-22,+2mar[2]/ 46,XY[2]
9	M	1945	dup MYC (84 %)	46,XY,t(X;12)(?p;q),der(17)t(8;17)(q?12;p?13)[13]/ 46,XY,der(X)t(1;12;X)(?p;q;p),t(3;4)(?p;q)[3]/ 46,XY[1]
20	M	1950	del ATM (98 %) del 13q14 (12 %) dup 2p (44 %)	46,XY,der(22)t(2;22)(p?p?) [3]/ 46,XY,der(20)t(2;20)(p?;?) [4]/ 46,XY,der(8)t(2;8)(p?p?) [1]/ 45,XY,t(2;13)(p?q?),?dic(4;22)(?p;p?13),t(6;22)(q?q?) [1]/ 45,XY,der(13)t(2;13)(p?q?),-21,der(22)t(2;22)(p?p?) [1]/ 46,XY,der(4)t(2;4)(p?q),der(11)t(2;11)(p?;?),der(18)t(5;13;18)(?;q;p)ins(18;5)(?;q) [1]/ 45,XY,?dic(4;22)(q39;q13) [2]/ 46,XY [5]
43	M	1924	del ATM (52 %) del 13q14 (76 %) del 6q21 (45 %) dup 8q24 (39 %)	46,XY,del(6)(q21),del(11q) [18]/ 47,XY,del(6)(q21),t(7;17)(p?22;q?22)+8,del(11)(q22.4),der(?)ins(?;13)(?;q?32)del(13)(q14) [2]
54	F	1958	del 13q14 (39 %)	46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21),t(9;13)(q?21;q?13),der(18)t(9;18)(?;p?11.2) [8]/ 46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21)t(9;22)(?;q?12),t(9;13)(q?21;q?13),der(18)t(9;18)(?;p?11.2) [3]/ 46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21),t(9;13)(q?21;q?13),der(16)t(11;16)(q;q?),der(18)t(9;18)(?;p?11.2) [3]/ 46,XX [3]
66	M	1962	del TP53 (82 %)	46,XY,der(3)t(3;8)(p?13;q?),der(4)t(X;4)(?;p?12) [8]/ 45,XY,-4,der(17)t(4;17)(q;p?13) [5]/ 46,XY [2]
69	M	1953	del ATM (53 %) dup 8q24 (53 %)	45,X,-Y,i(8)(q10),del(9)(p21),del(11)(q22),der(18)t(2;18)(p?11;p11) [5]/ 46,XY,i(8)(q10),del(9)(p21),del(11)(q22),der(18)t(2;18)(p?11;p11) [5]/ 46,XY [2]

Legenda: F - female (žena), M - male (muž), N - normální

**Tab XXI:** Přehled nalezených změn pomocí metod konvenční cytogenetiky a molekulární cytogenetiky u pacientů s B-CLL při vstupním a kontrolním vyšetření.

Č. pac.	pohlaví	věk v době dg.	Materiál	rok dg	Rok vstupního vyšetření	rok K	interval	Vstupní cytogenetické vyšetření	Cytogenetické vyšetření (K)	FISH vstupní vyšetření	FISH K
1.	M	49	KD	2005	2005	2011	6	UNS	ZM	ZM	ZM (+)
2.	M	71	PK	2010	2010	2011	1	NK	UNS	ZM	ZM
4.	M	70	PK	2009	2009	2011	2	UNS	ZM	ZM	ZM
9.	M	54	PK	2000	2000	2011	11	ZM	ZM (+)	ZM	ZM (+)
11.	M	62	PK	2006	2006	2011	5	NK	NK	ZM	ZM
16.	F	48	PK	2007	2011	2012	1	ZM	ZM (+)	ZM	ZM (+)
19.	M	57	PK	2006	2006	2011	5	ZM	ZM (+)	ZM	ZM (+)
20.	M	58	PK	2008	2008	2011	3	ZM	ZM (+)	ZM	ZM (+)
21.	F	63	PK	2005	2005	2011	6	UNS	UNS	N	ZM
23.	M	39	PK	2005	2005	2012	7	UNS	UNS	ZM	ZM (+)
24.	F	66	PK	2008	2008	2012	4	ZM	ZM (+)	N	ZM
25.	M	36	PK	2005	2005	2012	7	NK	ZM	N	ZM
26.	M	56	PK	2006	2006	2012	6	UNS	UNS	ZM	ZM (+)
28.	M	64	PK	1998	1998	2012	14	NK	NK	N	ZM
29.	M	56	PK	2009	2009	2012	3	NK	ZM	ZM	ZM (+)
30.	M	34	PK	2007	2007	2012	55	UNS	ZM	ZM	ZM
31.	M	63	PK	1998	1995	2012	17	ZM	UNS	N	ZM
33.	M	44	PK	2006	2007	2012	5	NK	NK	ZM	ZM (+)
38.	M	52	PK	2003	2003	2012	9	UNS	UNS	N	N
43.	M	83	PK	2007	2011	2012	1	ZM	ZM (+)	ZM	ZM
45.	M	57	PK	2004	2004	2012	8	UNS	UNS	N	ZM
46.	M	56	PK	2005	2005	2012	7	UNS	UNS	N	N
48.	F	60	PK	2007	2010	2012	2	ZM	ZM	ZM	ZM (+)
49.	F	66	PK	2010	2010	2012	2	ZM	ZM (+)	ZM	ZM (+)
51.	M	66	PK	2007	2007	2012	5	UNS	ZM	N	N
52.	F	55	PK	2002	2002	2012	10	NK	ND	N	ZM
53.	M	52	PK	2002	2002	2012	10	NK	ZM	N	ZM
54.	F	46	PK	2004	2004	2012	8	UNS	ZM	ZM	ZM

**Tab XXI, pokračování:** Přehled nalezených změn pomocí metod konvenční cytogenetiky a molekulární cytogenetiky u pacientů s B-CLL při vstupním a kontrolním vyšetření.

Č. pac.	pohlaví	věk v době dg.	Materiál	rok dg	Rok vstupního vyšetření	rok K	interval	Vstupní cytogenetické vyšetření	Cytogenetické vyšetření (K)	FISH vstupní vyšetření	FISH K
57.	M	52	KD	2003	2003	2012	9	UNS	UNS	N	ZM
59.	M	57	PK	2010	2010	2012	2	ZM	ZM	ZM	ZM (+)
60.	F	74	PK	2005	2005	2012	7	NK	UNS	ZM	ZM (+)
64.	M	53	PK	2007	2007	2012	5	NK	NK	N	ZM
66.	M	43	PK	2005	2005	2012	7	NK	NK	N	ZM
69.	M	57	PK	2010	2010	2012	2	ZM	ZM (+)	ZM	ZM (+)

Legenda: F - female (žena), M - male (muž), PK - periferní krev, KD - kostní dřev, K - kontrola, , NK - normální karyotyp, N - normální, UNS - unsuccessful (neúspěšné), ZM - změna: (+) u pacientů došlo k vývoji onemocnění a výskytu další změny,

### **Cytogenetika vstupní a kontrolní u 34 nemocných s kontrolním vyšetřením.**

Z 34 nemocných, u nichž bylo provedeno kontrolní vyšetření, mělo 11 nemocných normální karyotyp, u 4 z nich byly při kontrolním vyšetření prokázány chromozómové změny. 11 nemocných mělo v cytogenetice změny a pouze u dvou z nich (pac. č. 48, 59) nedošlo k dalšímu vývoji karyotypu, u 8 byly v kontrolním vyšetření prokázány další chromozómové změny nebo nárůst patologického klonu oproti vstupnímu vyšetření. U 10 pacientů bylo kontrolní vyšetření neúspěšné.

### **FISH vstupní a kontrolní u 34 nemocných s kontrolním vyšetřením**

Metodou FISH nebyly prokázány při vstupním vyšetření žádné změny u 14 nemocných, při kontrolním vyšetření byla prokázána změna u 11 z nich. U všech 20 nemocných s prokázanou změnou pomocí FISH v počátečním vyšetření, byly prokázány změny i při kontrolním vyšetření, u 14 z nich došlo k dalšímu vývoji karyotypu nebo nárůstu patologického klonu v souvislosti s progresí onemocnění.

Z celkového počtu všech 34 nemocných s kontrolním vyšetřením nebyly pouze u 2 nemocných (6 %) prokázány změny metodou FISH, u 32 nemocných (94 %) byly prokázány metodou FISH genetické změny. Z celkových 80 pacientů vyšetřených v době diagnózy byla u 30 pacientů (37,5 %) nalezena změna díky cytogenetickému vyšetření a u 51 pacientů (63,75 %) pomocí metody FISH. Celkově mělo 53 pacientů (66,25 %) změnu v cytogenetice a/nebo ve FISH. U pacientů vyšetřovaných kontrolně (34 pacientů) mělo 19 z nich (56 %) změnu v cytogenetice a 32 pacientů (94 %) změnu ve FISH. Tentokrát mělo celkem 32 pacientů (94 %) změnu v cytogenetice a/nebo ve FISH (shrnutí viz tabulka XXII).

**Tab XXII:** Počty pacientů s cytogenetickými a molekulárně-cytogenetickými změnami v době diagnózy a při kontrole

	Doba diagnózy (celkem 80 pacientů)		Kontrola (celkem 34 pacientů)	
	Počet pacientů	Procenta pacientů	Počet pacientů	Procenta pacientů
Změny v cytogenetice	30	37,5 %	19	56 %
Změny ve FISH	51	63,75 %	32	94 %
Změny v cytogenetice a/nebo ve FISH	53	66,25 %	32	94 %



## 5.4 Pacienti s jinou diagnózou

14 nemocných bylo vyšetřeno cytogeneticky a molekulárně cytogeneticky v rámci stážovacího diagnostického vyšetření pro podezření na onemocnění B-CLL. U těchto nemocných byla na základě morfologických, imunofenotypizačních a cytogenetických vyšetření prokázána jiná hematologická malignita. U jednoho nemocného se jednalo o myelodysplastický syndrom (MDS), u ostatních 13 nemocných o nehodgkinské lymfomy (NHL). Jedná se o 14 pacientů, 4 ženy a 10 mužů ve věku od 34 - 67 let. 6 pacientů bylo vyšetřeno z periferní krve a 8 nemocných bylo vyšetřeno z kostní dřeně. 1 pacient byl vyšetřen jak z kostní dřeně tak z periferní krve (pac. č. 93). Hodnoty nalezených změn jak v periferní krvi, tak v kostní dřeni leží na hranici cut of pro použité sondy a pacienta nelze hodnotit ve skupině nemocných s nalezenými změnami.

U nemocného č. 81 byla potvrzena diagnóza myelodysplastického syndromu, proto nebylo provedeno vyšetření k detekci B-CLL přestaveb, ale byla použita metoda M-FISH k detekci komplexních přestaveb karyotypu. U tohoto nemocného byla v karyotypu prokázána přítomnost derivovaného chromozómu 4, který vznikl zmnožením dlouhého ramene chromozómu 4 a translokací této oblasti na chromozóm 4: der(4)t(1;4). Kromě této změny, která byla prokázána ve všech hodnocených mitózách, byly metodou M-FISH potvrzeny další chromozómové přestavby, v každé mitóze jiné. Nález svědčí pro pokročilé stádium onemocnění a souvisí s progresí onemocnění a nepříznivou prognózou (viz kapitola Kasuistiky 5.6).

U pacienta č. 84 nebylo provedeno vyšetření s panelem sond pro B-CLL, nemocný podstoupil transplantaci KD a byl vyšetřen pouze sondou pro CEP X/Y k detekci dárcovského klonu.

U 4 nemocných byla prokázána přestavba IgH genu, u dvou pacientů (č. 91 a 92) je součástí t(11;14), u dalších dvou (pac. č. 82 a 83) součástí t(14;18). Delece 13q14 byla prokázána u 4 nemocných (č. 86, 88, 91 a 92), delece ATM byla prokázána u jednoho nemocného (č. 90). U 2 nemocných (81 a 88) byly prokázány komplexní přestavby, související s pokročilejším stádiem onemocnění.

**Tab XXIII:** Výsledky cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření u pacientů s jinou diagnózou.

č. pac.	pohlaví	věk	ročník	rok vyšetření	dg	rok dg	materiál	CY	ATM	p53	13q14	12	IgH	6q21	8q24
93	M	65	1947	2012	C85	2012	KD	ND	N	6	N	5	N	ND	6
							PK	UNS	N	9	N	12	N	N	7
83	F	40	1965	2012	C85	2005	PK	UNS	N	N	N	N	90 t(14;18)	N	N
84	M	53	1954	2012	C85	2007	PK	UNS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
92	F	39	1973	2012	C85	2012	PK	UNS	N	N	41	N	73 t(11;14)	N	N
82	M	61	1951	2012	C85	2012	KD	46,XY[12]	N	N	N	N	78 t(14;18)	N	N
85	M	67	1944	2012	C85	2011	KD	46,XY[11]	N	N	N	N	N	N	N
86	M	67	1944	2011	C85	2011	KD	46,XY[29]	N	N	18/53	N	N	N	N
87	M	54	1958	2012	C85	2012	KD	46,XY[30]	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND
90	M	65	1945	2012	C85	2010	KD	46,XY[16]	51	N	N	ND	ND	N	ND
91	M	59	1949	2012	MCL	2008	KD	46,XY[27]	ND	ND	13**	ND	9 t(11;14)	ND	ND
94	M	48	1963	2011	C85	2011	PK	46,XY[18]	N	N	N	N	N	N	N
81	M	34	1966	2012	MDS	2000	KD	46,XY,der(4)t(1;4)(q?12;p16)[15] 46,XY,der(4)t(1;4)(q?12;p16),der(17)t(1;17)(q?12;q?25)[3]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
88	F	40	1942	2012	C85	1982	PK	48,XX,+12,del(13)(q14),+19[7] 48,XX,+12,del(13)(q14),del(13)(q14),+19[3] 46,XX[5]	N	N	72/8	75	N	N	N
89	F	67	1945	2012	C85	2012	PK	46,XX,dup(12)(q13q?)t(3;12)(q27;q?12)[2] 46,XX[4]	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: F - female (žena), M - male (muž), PK - refírení krev, KD - kostní dřeň, ND - not done (neprovedeno), UNS - unsuccessful (neúspěšné), N - normální, \*\* - monozomie, C85 - lymfom, MDS - myelodysplastický syndrom, MCL - mantle cell lymfom - lymfom z buněk pláštěvé zóny

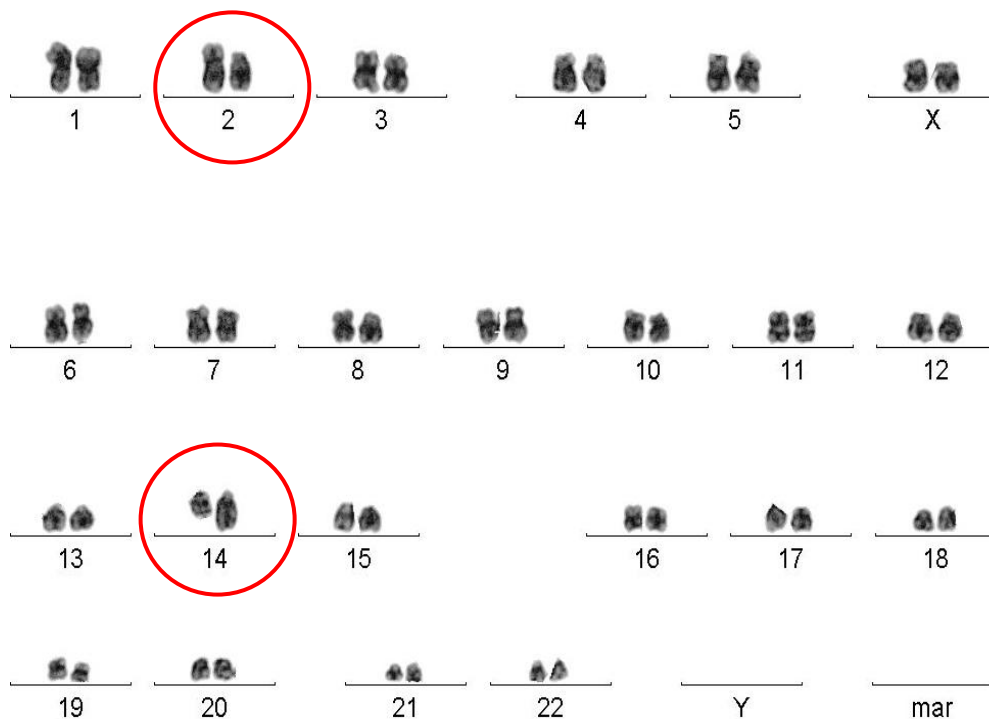
## 5.5 Kazuistiky

### Pacientka č. 80:

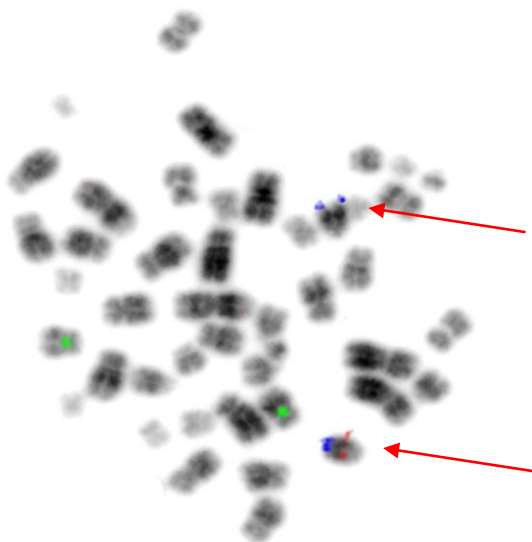
Pacientka (\* 1949) byla nejdříve vyšetřena na interní ambulanci v NsP Jeseník, kde byla v jejím krevním obraze detekovaná leukocytóza: 60 tisíc leukocytů, Hb 68 g/l a 78 tisíc trombocytů a s dominující lymfocytózou (76 %) v manuálním diferenciálním rozpočtu. Na Hemato-onkologickou kliniku FNOL byla přijata v září 2011 pro došetření leukocytózy, anémie a trombopenie. Nemocná se asi týden cítila více unavená, dušnější při mírné námaze s pocity tlaku na hrudi a také se jí více tvořily modřiny, teploty neměla. Dle Bineta byla hodnocena jako stádium Binet C. V krevním obraze při přijetí se vyskytovala výrazná leukocytóza (Leu  $50,70 \times 10^9/l$ ), Hb 66 g/l, Ery  $2,36 \times 10^{12}/l$ , Tr  $7,9 \times 10^9/l$ ). Na základě laboratorních výsledků a dle imunofenotypizačního vyšetření (70 % B-lymfocytů, které byly CD19+, CD20+, CD23+, CD38+ a CD5+) byla stanovena diagnóza chronické lymfocytární leukémie. V září 2011 byla zahájena terapie dle protokolu R-CHOP ve složení Mabthera, Endoxan, Vincristin. Pro doprovodnou autoimunitní hemolytickou anémii nasazena imunosupresivní pulzní terapie kortikoidy s postupnou stabilizací hemolýzy.

Bylo provedeno vstupní cytogenetické vyšetření, kterým bylo zachyceno 7 mitóz s normálním karyotypem a 2 mitózy s chromozómovými přestavbami (Obrázek 12). Metodou FISH byla prokázána delece 13q14 a přestavba IgH (Obrázek 13 a 14.).

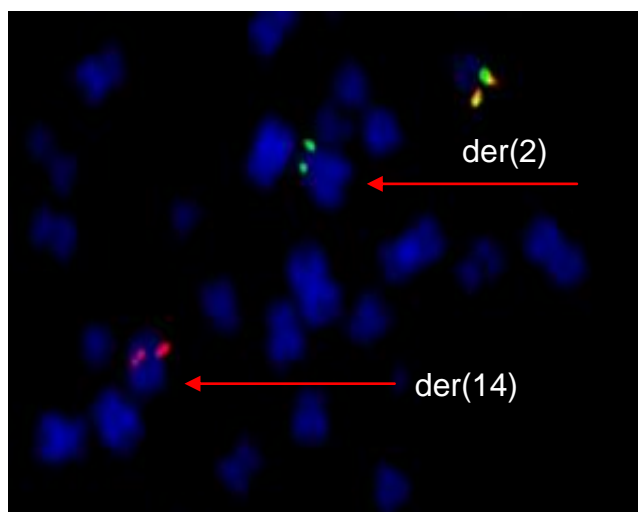
**Obr. č. 12:** Cytogenetický nález u pacientky č. 80 s karyotypem: 46,XX,?der(2p),add(14q)



**Obr. č. 13:** Výsledek molekulární cytogenetiky – FISH se sondou *LSI cep12/13q14/13q34*, Abbott (červený signál pro 13q14, modrý pro 13q34 a zelený pro centromeru 12).

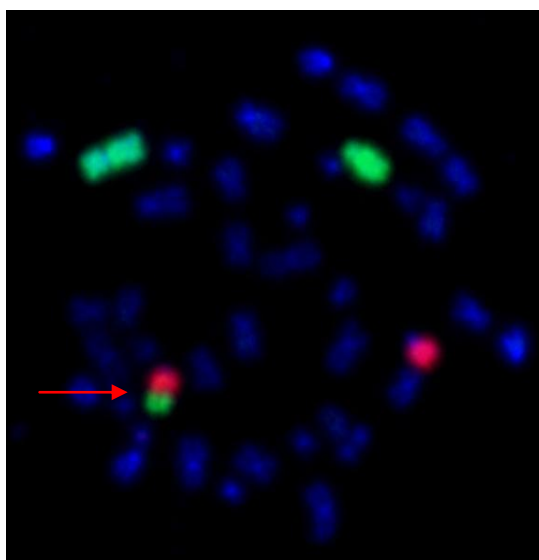


**Obr. č. 14:** Výsledek molekulární cytogenetiky – FISH se sondou *LSI IgH, Kreatech* (červený signál pro 3'oblast IgH na der(14), zelený signál pro 5'oblast IgH na der(2) a fúzní signál pro IgH)



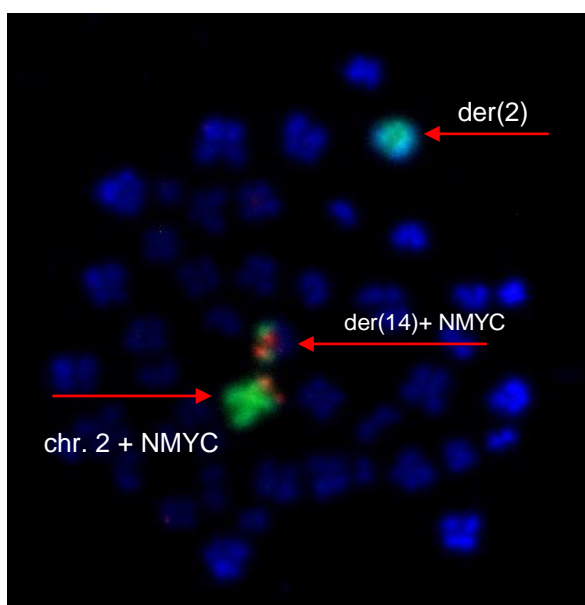
5'oblast IgH se nacházela na derivovaném chromozómu 2 - translokace t(2;14) byla prokázána hybridizací s celochromozómovými/paintingovými (wcp) sondami pro chromozóm 2 a 14 (viz Obrázek 15).

**Obr. č. 15:** Výsledek molekulární cytogenetiky - FISH se sondami *wcp 14 SO* (červený signál) a *2 F* (zelený signál) *MetaSystems* potvrzující translokaci t(2;14) - označeno šipkou.



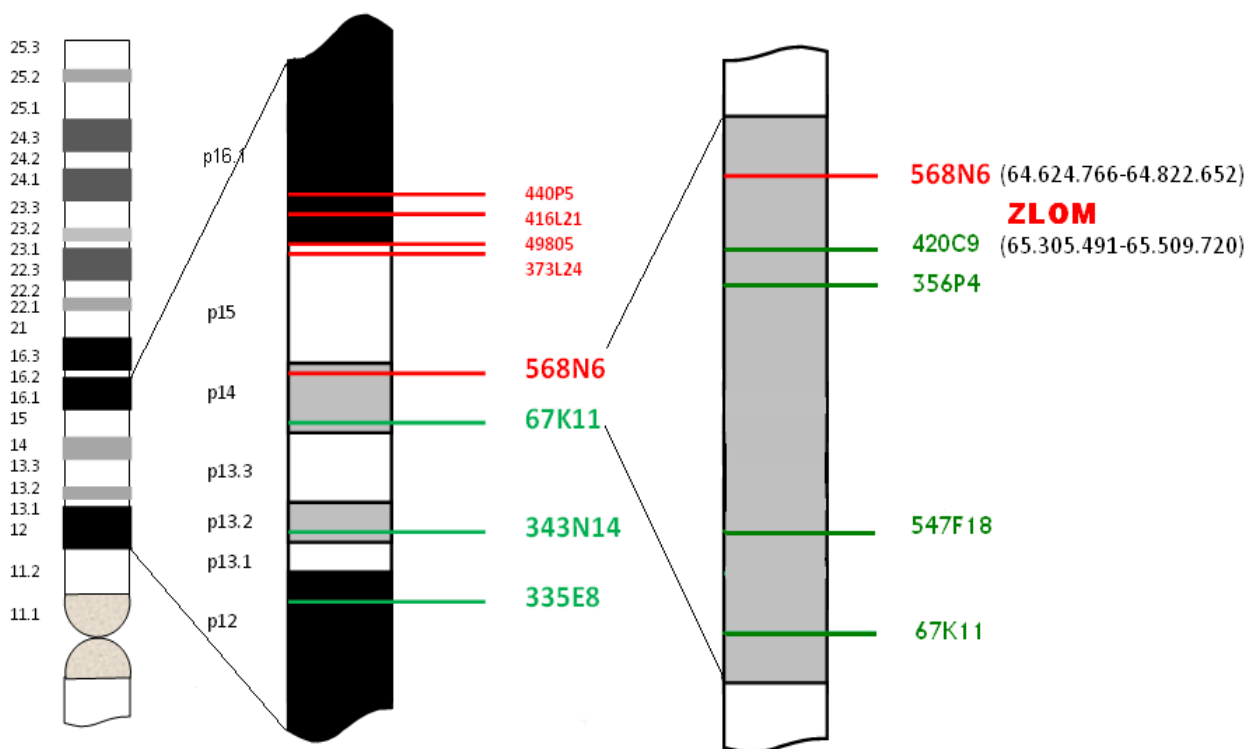
K průkazu, zda došlo ke zmnožení oblasti 2p a ověření lokalizace oblasti 2p24 (N-MYC) byla použita FISH se sondou *LSI NMYC Abbott* (viz Obrázek 16).

**Obrázek 16:** Výsledek molekulární cytogenetiky - FISH se sondami *Wcp 2 F* *MetaSystems/LSI N-MYC SO Abbott* - translokace t(2;14), kde se gen N-MYC (červený signál) nachází na der(2) a der(14)



S použitím <http://atlasgeneticsoncology.org/>, kde jsou zobrazeny časté geny, se kterými IgH vstupuje do translokací, bylo určeno pravděpodobné zlomové místo na chromozómu 2, konkrétně gen BCL11A. Pomocí <http://www.ensembl.org/> byly vyhledány BAC sondy, kterými se mapovalo místo zlomu (RP11 - 440P5, RP11 - 416L21, RP11 - 49805, RP11 - 373L24, RP11 - 335E8, RP11 - 343N14, RP11 - 67K11, RP11 - 568N6, RP11-420C9). Takto bylo postupně zlomové místo určeno v místě 2p14 (Obrázek 17)

**Obrázek 17:** Schéma mapování místa zlomu na 2p



U této pacientky bylo tedy zjištěno nové zlomové místo v 2p14, kde došlo ke zlomu a reciproké translokaci s IgH na chromozómu 14. Dále byl prokázán klonální vývoj, kdy se v 1. klonu nachází pouze delece 13q14 a v 2. klonu delece 13q14 a zároveň přestavba IgH. Na základě vývoje onemocnění byla nemocná zařazena do stádia Binet C.

### **Pacientka č. 71:**

U této pacientky (\* 1937) se již od roku 2005 projevovala leukocytóza a v roce 2009 již byla diagnostikována B-CLL. Z Prostějova byla do Olomouce odeslána pro progredující splenomegálii (200\*70 mm). V září 2012 lze v krevním obraze vidět: Leukocyty pr. [WBC] B: 92,47, Erytrocyty pr. [RBC] B: 3,71, Hemoglobin [HGB] B: 111, Trombocyty pr. [PLT] B: 102. Díky pozitivitě CD38+ stanoveno stádium Binet B, pacientka však v tuto dobu ještě nesplňovala kritéria pro zahájení léčby. Odebraná periferní krev byla poslána na vyšetření molekulární biologií a cytogenetikou. Tímto byla zjištěna klonální populace B-lymfocytů v periferní krvi, nemutovaný status IgVH a další cytogenetické změny: bialelická delece 13q14 v 64 % hodnocených buněk, monoalelická delece v 10 % a fyziologická delece IgVH v 74 %. Kromě CD38+ byla u pacientky zjištěna i pozitivita ZAP-70 (86 %). Při kontrole o dva měsíce později došlo k progresi trombopenie (87) a B symptomů, stádium bylo

přehodnoceno z Binet B na Binet C, a byla tedy zahájena terapie dle NCI - redukovaný FluCy. V únoru 2013 je pacientka po 2. cyklu léčby, progreduje u ní anémie, ale játra byla nezvětšena, slezina i lymfatické uzliny nehmatné. Z krevního obrazu: Leukocyty pr. [WBC] B: 2,06, Erytrocyty pr. [RBC] B: 3,61, Hemoglobin [HGB] B: 108, Trombocyty pr. [PLT] B: 73.

Pomocí konvenční cytogenetiky nebylo možné určit chromozómové změny, protože v materiálu se nenacházelo dostatečné množství mitóz, metodou FISH však byla zjištěna bialeická delece 13q14 v 62 % a přestavba IgH v 86 %. Dále byly použity celochromozómové sondy firmy MetaSystems a lokusově specifické sondy Kreatech v kombinacích:

wcp 13 (F)/wcp 17 (SO)

wcp 15 (F)/wcp 16 (SO)

LSI 1p36/1q21/wcp 16 (SO)

LSI 1p36/1q21/wcp 13 (SO)

Byly prokázány chromozómové změny ve více klonech, proto byla použita metoda M-FISH na buňkách z nového odběru PK.

Kombinací metody M-FISH a FISH s celochromozómovými a genovými sondami byly nalezeny 3 klony:

1. klon: 46,XX

2. klon: 46,XX,t(1;16;15)(p?21;q?23;q?25)

3. klon: 46,XX,der(1)t(1;13)(q?36;q?33),t(13;17)(q?13;q?12)

### **Pacient č. 56:**

Pacient byl diagnostikován na základě imunofenotypizace jako B-CLL v Novém Jičíně. Od počátku roku již pacient pociťoval potíže jako noční pocení, únava, zadýchávání, bolest svalů a později i noční dušnost. Pro tyto projevy byl hospitalizován, čímž byla zjištěna těžká anémie, hepatomegalie, splenomegalie, uzliny v epigastriu 45\*30 mm, oboustranně v pleurální dutině tekutina, mediastinální uzliny 2 cm. Do Olomouce byl přijat pro anemický syndrom při lymfoproliferaci NS. Při kontrole v ambulanci FNOL vyšetřen krevní obraz: Leukocyty pr. [WBC] B: 119,91, Erytrocyty pr. [RBC] B: 3,05, Hemoglobin [HGB] B: 96, Trombocyty pr. [PLT] B: 64. V periferní krvi se dále nacházelo 83 % B-lymfocytů, které nesly znaky CD19+, CD20+, CD23+, CD38+ a CD5+. U pacienta byla tedy během



hospitalizace zahájena terapie CHOP: Endoxan, Adriablastina, Vincristin, Rednison, provedena substituce Ery a ve stabilizovaném stavu byl propuštěn do domácí péče. Diagnóza byla uzavřena jako B-CLL, Binet C s nemutovaným IgVH, delecí 17p13 (TP53), delecí 13q14 a duplikací 8q24 (MYC). Po kontrolním vyšetření zjištěna splenomegalie, zvětšené lymfatické uzliny, nodulace v pravé plíci, korová cysta levé ledviny, což značí transformaci do lymfomu. Bylo indikováno zintenzivnění léčby a počátkem listopadu 2012 bylo také zahájeno vyhledávání dárce k allogenní nepříbuzenské transplantaci krvetvorných buněk. HLA-identický dárce byl nalezen a transplantace je zatím plánovaná na březen 2013.

Jak už bylo uvedeno výše, po vyšetření metodou FISH byly zjištěny prognosticky nepříznivé cytogenetické změny: delece TP53 (17p13, 89 %), delece 13q14 (31 %) a duplikace MYC (8q24, 77 %). Vzhledem k těmto výsledkům a výsledkům klasické cytogenetiky bylo vyšetření dále doplněno i o metodu M-FISH, která odhalila komplexní změny v karyotypu pacienta:

1. klon: 44,XY,der(X)t(X;8)(?:q24),der(6)t(6;7)(p?24;q?21)ins(6;Y)(p?24;q?11),-7, dic(17;18)(p?11;p?11),der(20)t(7;20)(?:q?23)[8]
2. klon: 43,XY,der(X)t(X;8)(?:q24),der(6)t(6;7)(p?24;q?21)ins(6;Y)(p?24;q?11),-7, ?dic(15;22)(p?11;p?11),dic(17;18)(p?11;p?11),der(20)t(7;20)(?:q?23)[2]

K potvrzení a přesné identifikaci několika změn byly použity i celochromozómové (MetaSystems) a centromerické sondy (Abbott).

### **Pacient č. 81:**

U tohoto pacienta nebyla diagnostikována B-CLL, jedná se o pacienta s myelodysplastickým syndromem typu RA s periferní pancytopenií a trombopenií. Lymfatické uzliny v periferních lokalizacích nebyly hmatné, břicho bez patologické rezistence, játra nezvětšena, slezina nehmatná, dolní končetiny bez otoků a kůže bez patologického nálezu. Od prosince 2006 léčen kortikoidy.

Klasickou cytogenetikou bylo zjištěno:

- Prosinec 2011: 46,XY,-4,+mar[25]  
 Srpen 2012: 46,XY,-4,+mar[7]  
 Neklonální změny: 46,XY,-4,-12,+2mar[2]  
 46,XY,-4,-8,+2mar[1]

Metodou FISH a M-FISH byla prokázány chromozómové změny :

Leden 2012: Trizomie chromozómu 8 (8 %)

Monozomie chromozómu 7 (2 %)

Srpen 2012: 46,XY,der(4)t(1;4)(q?12;p16)[15]/

46,XY,der(4)t(1;4)(q?12;p16),der(17)t(1;17)(q?12;q?25)[3]/

46,XY,der(4)t(1;4)(q?12;p16)t(1;4)(q?12;q?34)[1]/

46,XY,der(5)t(1;5)(q?12;p?15),der(12)t(1;12)(q?12;q?24)[1]/

46,XY,t(X;1)(q?25;p?21),der(4)t(1;4)(q?12;p16)[1]

Pro progresi onemocnění a nález komplexních změn v cytogenetice zvážení další terapie a transplantace kostní dřeně.

## 5.6 Statistická analýza

Ke statistickému zpracování byl použit statistický software SPSS verze 15, SPSS Inc. Chicago USA. Všechny testy byly provedeny na hladině statistické významnosti 0,05. Statisticky významné p hodnoty jsou zvýrazněny tučným písmem.

Data byla uspořádána do kontingenčních tabulek a následně byl proveden Fisherův přesný test. Pro zhodnocení statistické významnosti odchylek v jednotlivých buňkách tabulky byl použit výpočet adjustovaných reziduí. Pomocí adjustovaných reziduí je možné zjistit, zda se pozorované četnosti v jednotlivých buňkách odlišují statisticky významně od očekávaných četností. Za statisticky významně rozdílné se považují odchylky, u kterých je hodnota adjustovaného rezidua větší než 1,96 nebo menší než -1,96. Četnosti v těchto buňkách jsou zvýrazněny tučným písmem.

**Tab XXIV:** Kontingenční tabulka s četnostmi pacientů s mutovaným a nemutovaným stavem IgVH/mutovaným v segmentu VH3-21 v závislosti na stádiu dle Bineta.

**Kontingenční tabulka**

			Mutační stav		Celkem
			mut	nem nebo mut*	
Binet	A	Četnost	17	19	36
		%	47,2%	52,8%	100,0%
	B	Četnost	5	15	20
		%	25,0%	75,0%	100,0%
	C	Četnost	3	14	17
		%	17,6%	82,4%	100,0%
Celkem		Četnost	25	48	73
		%	34,2%	65,8%	100,0%

**Tab XXV:** Výsledek Fisherova přesného testu - statistická významnost závislosti Bineta na mutačním stavu IgVH genu

	Hodnota	Oboustranná exaktní signifikance
Fisherův přesný test	5,275	,068
Počet platných případů	73	

Fisherovým přesným testem nebyl prokázán statisticky významný vztah mezi veličinami „Binet“ a „Mutační stav“ ( $p > 0,05$ ). Nicméně hodnota  $p$  se blíží 0,05, je tedy možné vidět trend zvyšujících se procent pacientů s nemutovaným/mutovaným IgVH v segmentu VH3-21 s vyšším stádiem onemocnění dle Bineta.

**Tab XXVI:** Kontingenční tabulka s četnostmi pacientů s pozitivní a negativní expresí ZAP-70 v závislosti na stádiu dle Bineta.

**Kontingenční tabulka**

			ZAP70		Celkem
			poz	neg	
Binet	A	Četnost	24	1	25
		%	96,0%	4,0%	100,0%
	B	Četnost	15	1	16
		%	93,8%	6,3%	100,0%
	C	Četnost	10	1	11
		%	90,9%	9,1%	100,0%
Celkem		Četnost	49	3	52
		%	94,2%	5,8%	100,0%

**Tab XXVII:** Výsledek Fisherova přesného testu - statistická významnost závislosti Bineta na pozitivitě znaku ZAP-70

	Hodnota	Oboustranná exaktní signifikance
Fisherův přesný test	,938	,783
Počet platných případů	52	

Fisherovým přesným testem nebyl prokázán statisticky významný vztah mezi veličinami „Binet“ a „ZAP 70“,  $p > 0,05$ . Výsledek je dán malým souborem vyšetřených pacientů.

**Tab XXVIII:** Kontingenční tabulka s četnostmi pacientů s pozitivní a negativní expresí CD38 v závislosti na stádiu dle Bineta.

**Kontingenční tabulka**

			Expresie CD38		Celkem
			poz	neg	
Binet	A	Četnost	<b>10</b>	<b>27</b>	37
		%	<b>27,0%</b>	<b>73,0%</b>	100,0%
		Adjustované reziduum	-2,7	2,7	
B	B	Četnost	12	8	20
		%	60,0%	40,0%	100,0%
		Adjustované reziduum	1,9	-1,9	
C	C	Četnost	9	7	16
		%	56,3%	43,8%	100,0%
		Adjustované reziduum	1,3	-1,3	
Celkem		Četnost	31	42	73
		%	42,5%	57,5%	100,0%

**Tab XXIX:** Výsledek Fisherova přesného testu - statistická významnost závislosti Bineta na pozitivitě znaku CD38

	Hodnota	Oboustranná exaktní signifikance
Fisherův přesný test	7,349	<b>,026</b>
Počet platných případů	73	

Fisherovým přesným testem byl prokázán statisticky významný vztah mezi veličinami „Binet“ a „Expresie CD38“ ( $p = 0,026$ ). U pacientů klasifikovaných stupněm A je statisticky významně vyšší podíl negativní exprese CD38 a statisticky významně nižší podíl pozitivní exprese CD 38.

**Tab XXX:** Kontingenční tabulka s četnostmi pacientů s výskytem negativních prognostických cytogenetických změn (A - ano, N - ne) v závislosti na stádiu dle Bineta.

**Kontingenční tabulka**

			fish - negat prog.zn.		Celkem
			A	N	
Binet	A	Četnost	9	29	38
		%	23,7%	76,3%	100,0%
	B	Četnost	9	13	22
		%	40,9%	59,1%	100,0%
	C	Četnost	9	8	17
		%	52,9%	47,1%	100,0%
Celkem	Četnost	27	50	77	
	%	35,1%	64,9%	100,0%	

**Tab XXXI:** Výsledek Fisherova přesného testu - statistická významnost závislosti Bineta na výskytu negativních prognostických cytogenetických změn

	Hodnota	Oboustranná exaktní signifikance
Fisherův přesný test	4,875	,095
Počet platných případů	77	

Fisherovým přesným testem nebyl prokázán statisticky významný vztah mezi veličinami „Binet“ a „FISH“ ( $p = 0,095$ ). Nicméně lze pozorovat trend ve zvyšujících se procentech negativních prognostických znaků se stoupajícím stádiem onemocnění dle Bineta.

## 6 Diskuze

B-CLL je velice heterogenním maligním hematologickým onemocněním. Ke včasnému určení prognózy a zahájení účinné léčby se používá studium několika prognostických markerů - klasické, imunofenotypické, molekulární a cytogenetické. Tato práce je zaměřena na studium těchto prognostických faktorů se zaměřením na výsledky cytogenetického a molekulárně-cytogenetického (FISH) vyšetření.

Medián věku při diagnóze byl u našeho souboru nemocných 58 let s rozmezím 34 - 84 let. Vyšetřeno bylo celkem 60 mužů a 20 žen (3:1). Pacientů mladších 50-ti let bylo celkem 13 (16,25 %). Tyto hodnoty se blíží datům uváděných v literatuře, kde se uvádí medián věku pacientů v době diagnózy 65 let a pouze 10 - 15 % pacientů mladších 50-ti let (Rozman C. *et* Montserrat E., 1995). V souboru pacientů mladších 50-ti let bylo 11 mužů a 2 ženy. Prognóza těchto pacientů byla horší, 10 pacientů (77 %) mělo nemutovaný IgVH status, u jednoho pacienta nebylo vyšetření provedeno. CD38 pozitivní exprese nebyla statisticky významná, pouze 4 pacienti mladších 50-ti let mělo CD38+. Cytogenetické vyšetření u těchto pacientů prokázalo negativní prognostické změny (u 7 pacientů - 54 %) a u 4 pacientů původně s normálním karyotypem, příp. delecí 13q14, došlo k progresi onemocnění (31 %). K progresi zatím nedošlo pouze u 2 pacientů (15 %). Tyto výsledky potvrzují studii Maura *et al.* (2013), že u mladší populace jsou s nemocí spojena vyšší rizika.

Z celkových 76 pacientů vyšetřených na mutační status IgVH bylo nalezeno 45 pacientů s nemutovaným IgVH genem (59 %). Vzhledem k malému souboru pacientů nebyl Fisherovým přesným testem prokázán statisticky významný vztah mezi mutačním stavem IgVH a stádiem dle Bineta. Hodnota  $p$  se však blíží 0,05, lze pozorovat trend zvyšujících se procent pacientů s nemutovaným/mutovaným IgVH v segmentu VH3-21 s vyšším stádiem onemocnění dle Bineta. 20 pacientů s nemutovaným IgVH genem mělo současně pozitivní expresi CD38 (44,4 %). Mutovaný IgVH status mělo 25 pacientů (33 %), z nichž 7 pacientů mělo pozitivní expresi CD38 (28 %). Pacienti s nemutovanými geny IgVH mají dle Damle *et al.* (1999) vyšší pravděpodobnost výskytu CD38 pozitivních B-lymfocytů, což zde nelze spolehlivě prokázat vzhledem k malému souboru sledovaných pacientů. Mutovaný gen IgVH v segmentu VH3-21 byl nalezen u 6 pacientů, dle Tobina *et al.* (2002) se jedná o negativní prognostický faktor a je spojena s vyšším výskytem delece genu TP53. To se nepodařilo potvrdit, nicméně u 4 pacientů se vyskytovaly jiné negativní faktory - delece ATM (3 pacienti) a přestavba IgH.

Damle *et al.* (1999) a Kröber *et al.* (2002) uvádí, že CD38 exprese u pacientů s B-CLL je spojena s krátkým přežitím a nemutovaným stavem IgVH. Z celého námi studovaného souboru bylo 31 pacientů (z celkových 80 - 39 %), kteří měli pozitivní expresi CD38. Fisherovým přesným testem byl prokázán statisticky významný vztah mezi stádiem dle Bineta a expresí CD38 ( $p = 0,026$ ). U pacientů se stádiem A je statisticky významně vyšší podíl negativní exprese CD38 a statisticky významně nižší podíl pozitivní exprese CD38. Z těchto CD38 pozitivních pacientů mělo 27 pacientů (87 %) nemutovaný IgVH status, 3 pacienti (10 %) měli mutované IgVH v segmentu VH3-21. Přežívání není možné vzhledem ke krátké době sledování vyhodnotit.

Chromozomální aberace se vyskytují u 82 % nemocných. Nejčastějšími změnami bývají delece 13q (55 %), delece 11q (18 %), trizomie 12 (16 %), delece 17p (7 %) a delece 6q (6 %). Nejzávažnější aberací je delece 17p (popř. TP53) a také 11q (ATM), (Döhner *et al.*, 2000). U studovaného souboru se nejčastěji vyskytovala také delece 13q14. U pacientů, kteří měli jen 1 změnu, se vyskytovala delece 13q14 u 59 %, delece ATM v 21 % a trizomie 12, delece 6q21, monozomie 13 a duplikace 8q24 v 5 %. Další aberace se samostatně nevyskytovaly. Statisticky významný vztah mezi výskytem negativních cytogenetických změn a stádiem dle Bineta nebyl potvrzen, avšak existuje trend ve zvyšujících se procentech negativních prognostických znaků se stoupajícím stádiem onemocnění dle Bineta.

Delece 13q14 je nejčastější genetickou změnou vyskytující se u pacientů s B-CLL. (Döhner *et al.*, 2000). Kromě varianty monoalelické delece se vyskytuje také delece bialelická, popř. obě varianty zároveň (Chena *et al.*, 2008). Tyto výsledky potvrzují i zjištění, že v našem souboru pacientů se nejčastěji vyskytovala monoalelická delece 13q14 (35 pacientů - 45,5 %), 5 pacientů (6,5 %) mělo monoalelickou delecí 13q14 současně s bialelickou delecí, bialelickou delecí 13q14 samostatně měl pouze 1 pacient (ale současně s trizomií 12).

Delece ATM byla prokázána u 16 pacientů (21 %) a u 5 pacientů (6,5 %) se vyskytovala další chromozómová změna. Další změnou prokázanou současně s delecí ATM byla delece 13q14, 6q21, duplikace 8q24, 2p a delece 9p21.

Celkem 7 pacientů (9 %) bylo pozitivních na delecí TP53. Pacienti s delecí TP53 mají nejkratší medián přežití a bývají u nich nelézány další negativní prognostické faktory (Papajík *et al.*, 2006). To souhlasí s výsledky uvedenými v této práci. Žádný nemocný neměl tuto aberaci samostatně, vždy byla nalezena další genetická změna (delece 13q14, duplikace MYC, duplikace 2p, dic(4;16), monozomie 15, dokonce i delece ATM). Nález delece ATM současně s TP53 je neobvyklý a svědčí o pokročilém stádiu onemocnění, jedná se tedy o velmi nepříznivou prognózu. 6 pacientů s delecí TP 53 mělo nemutovaný IgVH status a 3

pacienti také CD38+ expresi. Přežívání nemůžeme vzhledem ke krátké době sledování hodnotit.

U 6 (8 %) nemocných byla prokázána trizomie chromozómu 12, jako samostatná změna byla trizomie 12 prokázána pouze u 2 pacientů a ani u jednoho pacienta nebyla prokázána současně s delecí ATM nebo delecí TP53. Trizomii 12 současně s trizomií 19 (Juliusson *et Merup*, 1998; Ibbotson *et al.*, 2012) jsme zachytili ve dvou případech (2,5 %).

Duplikace MYC (8q24) byla v našem souboru potvrzena u 7 nemocných (8 %). Jednalo se o 1 ženu (věk 78 let) a 6 mužů ve věku od 54 - 83 let. U 1 nemocného byla prokázána parciální delece 3' MYC (muž, 60 let). Put *et al.* (2012) spojuje duplikaci MYC převážně s mužským pohlavím, což odpovídá našemu souboru, a pokročilým věkem pacientů. To není možné v této práci potvrdit. S duplikací MYC byly prokázány další chromozómové změny, kromě jednoho pacienta, u kterého se však prokázaly další změny při kontrole.

U 4 nemocných se vyskytla delece 6q21 (6,8 %), což souhlasí s prací Stilgenbauera *et al.* (1999), kde se delece 6q21 vyskytuje u 7 % pacientů. U každého pacienta byla prokázána ještě jiná genetická změna (1 pacient s výskytem změny na úrovni cut of levelu pro použitou sondu).

Translokace IgH genu nebývá u pacientů s B-CLL tak častá (Döhner *et al.*, 2000 uvádí ~ 4 %). V našem souboru pacientů se přestavba IgH nacházela u 2 pacientů (3 %), což odpovídá literárním datům. Kromě translokací genu se vyskytují delece 3' konce IgH (Berkova *et al.*, 2008) nebo delece 5' konce IgH genu - fyziologická delece (FD), (Wlodarska *et al.*, 2007). Fyziologickou delecí IgVH jsme prokázali u 11 nemocných, z toho u jednoho se jednalo o delecí biálelickou.

Zmnožení 2p se vyskytuje v mnoha variantách. Jedná se např. o derivované chromozómy, částečné trizomie, nevyvážené translokace apod., což bývá součástí komplexních změn v karyotypu pacienta. Samostatně se tato změna nevyskytuje a souvisí s progresí onemocnění (Jarošová *et al.*, 2010). Z celkového souboru bylo na zmnožení 2p vyšetřeno pouze 8 pacientů, u 3 nemocných byla prokázána duplikace (popř. triplikace) 2p a u 1 nemocného byla prokázána translokace t(2;14) bez zmnožení materiálu chromozómu 2. 1 pacient měl delecí TP53 a 13q14, další 3 měli delecí ATM (tuto změnu samostatně s 2p+ nebo společně s delecí 9p21/13q14). 3 pacienti měli nemutovaný IgVH status, 1 mutovaný v segmentu VH3-21 a 3 pacienti pozitivní expresi CD38+. To odpovídá výsledkům práce Fabrise *et al.* (2013), který spojuje zmnožení 2p s nálezem nepříznivých cytogenetických delecí (ATM, TP53), nemutovaným statusem IGVH a expresí CD38.



U 13 pacientů byly prokázány komplexní přestavby karyotypu. Nález svědčí o progresi onemocnění a je spojen se špatnou prognózou a rezistencí vůči chemoterapii (Koski *et al.*, 2000).

## 7 Závěr

Hlavním cílem práce bylo, kromě shromáždění literárních údajů o prognostických chromozómových změnách u pacientů s B-CLL, také stanovit a detekovat genetické změny u souboru nemocných s B-CLL pomocí FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a statisticky vyhodnotit výsledky.

Detekovanými změnami v souboru pacientů byla nejčastější delece 13q14 (monoalelická/bialelická), dále delece ATM, delece TP53, trizomie chromozómu 12, duplikace MYC, parciální delece MYC, fyziologická delece IgH, přestavba IgH, delece 6q21, zmožení krátkého ramene 2. chromozómu, delece 20q, případně jiné změny.

Výsledky v této potvrzují, že detekce chromozómových změn u pacientů s B-CLL má velký význam v určování prognózy pacientů a také z hlediska volby léčebné strategie. Výsledky však nelze vzhledem k malému souboru pacientů a krátké době sledování statisticky jednoznačně vyhodnotit (s výjimkou negativitu CD38 u pacientů se stádiem dle Bineta A), lze pouze sledovat trend v závislosti některých faktorů. Statistické hodnocení bude předmětem dizertační práce, kde bude soubor nadále sledován a hodnocen.

## 8 Seznam použitých zkratek

A	adenin
ATM	ataxia telangiectasia mutated
B-CLL	chronická B-lymfocytární leukémie
BM médium	bone marrow medium; médium pro kostní dřeň
bp	base pair - páry bazí (kbp - kilobáze, Mbp - megabáze)
C	cytosin
CCD kamera	charge-coupled device camera; kamera s technologií snímání obrazu
CD	cluster of differentiation; diferenciační antigen
CEP	označení pro centromerickou sondu
CY	cytogenetika
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBSS	Earle's balanced salt solution; Earlův oplachovací roztok
F	female (žena)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
G	guanin
H	heparin
Hb	hemoglobin
HSCs	Hematopoetic Stem Cells - hematopoetické kmenové buňky
<i>in situ</i>	„na místě“
<i>in vitro</i>	„ve zkumavce“
K	kultivace
kD	kiloDalton
K24	kultivace 24 hodin
KCl	Chlorid sodný
KD	kostní dřeň
LSI	označení pro lokusově specifickou sondu
M	male (muž)
mar	marker
MCL	mantle cell lymphom - lymfom z buněk plášťové zóny
MDS	myelodysplastický syndrom
M-FISH	multicolor FISH; mnohobarevná FISH

miRNA	micro ribonukleová kyselina
N	normální nález
ND	not done (neprovedeno)
NK	normální karyotyp
NK-buňky	natural killer buňky; druh lymfocytu
PI-3-K	fosfatidylinositol-3-kináza
PK	periferní krev
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	rounds per minute; otáčky za minutu
RT	room temperature; pokojová teplota
SG	spectrum green; zelené spektrum
SO	spectrum orange; oranžové spektrum
SOP	standardní operační postup
SSC	saline-sodium citrate buffer; citrátový solný pufr
T	thymin
UNS	unsuccessful (neúspěšné)
WCP	označení pro celochromozómovou sondu
WHO	World Health Organization - Světová zdravotnická organizace

## 9 Seznam použité literatury

Adam Z, Vorlíček J *et al.*, 2001: Hematologie II, Přehled maligních hematologických nemocí. Grada Publishing, spol. s.r.o., 1. vydání, kap.: Chronická B-lymfocytární leukémie, 311-338.

Aguilar-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M, 1996: *Bcl-2*, *Bax* and *p53* expression in B-CLL in relation to *in vitro* survival and clinical progression. *International Journal of Cancer* 69:114-119.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL., 2000: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774):193-197.

Alessio M, Roggero S, Funaro A, De Monte LB, Peruzzi L, Geuna M, Malavasi F, 1990: CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells. *J Immunol* 145:878-84.

Bannerji R, Byrd JC, 2000: Update on the biology of chronic lymphocytic leukaemia. *Curr Opin Oncol* 12:22-29.

Bayani J, Squire JA, 2004: Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol.*, Chapter 22: Unit 22.4.

Berkova A, Pavlistova L, Babicka L, Houskova L, Tajtlova J, Balazi P, Cmunt E, Schwarz J, Karban J, Trneny M, Brezinova J, Zemanova Z, Michalova K, 2008: Combined molecular biological and molecular cytogenetic analysis of genomic changes in 146 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 55(5):400-8.

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F, 1981: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198-206.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu Ch-g, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM, 2005: A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 353:1793-1801.

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Schimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM, 2005: A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The N Engl J Med* 353:1793-1801.

Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliacci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R, 1998: p53 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Marker of Disease Progression and Poor Prognosis. *Blood* 91(11):4342-9.

Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliacci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R, 1998: p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 91:4342-4349.

Craig JM, Bickmore WA, 1993: Chromosome bands--flavours to savour. *Bioessays*. 15(5):349-54.

Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E, 2003: ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 348:1764-1775.

Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Tammiso E, Agostini P, Ciccone M, Della Porta M, Tieghi A, Cavazzini L, Negrini M, Castoldi G, 2004: Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 18:476-483.

Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Husman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N, 1999: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 94:1840-1847.

Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N, 1999: Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 94(6):1840-7.

di Raimondo F, Giustolisi R, Lerner S, Cacciola E, O'Brien S, Kantarjian H, Keating MJ, 2001: Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Annals of Oncology* 12:621-625.

Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C, 2009: The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype TP53 mutations predict poor prognosis in CLL. *Leukemia* 23:117-124.

Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Banner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustka A, Hunstein W, Richter P, 1995: p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias. *Blood*. 85(6):1580-1589.

Döhner H, Stilgenbauer S, banner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P, 2000: Genomic aberrations and surfoval in chronic lymphocytis leukemia. *N Engl J Med* 343:1910-1916.

Fabris S, Mosca L, Todoerti K, Cutrona G, Lionetti M, Intini D, Matis S, Colombo M, Agnelli L, Gentile M, Spriano M, Callea V, Festini G, Molica S, Deliliers GL, Morabito M, Ferrarini M, Neri A, 2008: Molecular and Transcriptional Characterization of 17p Loss in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 47(9):781-93.

Fabris S, Mosca L, Cutrona G, Lionetti M, Agnelli L, Ciceri G, Barbieri M, Maura F, Matis S, Colombo M, Gentile M, Recchia AG, Anna Pesce E, Di Raimondo F, Musolino C, Gobbi M, Di Renzo N, Mauro FR, Brugiattelli M, Ilariucci F, Lipari MG, Angrilli F, Consoli U, Fragasso A, Molica S, Festini G, Vincelli I, Cortelezzi A, Federico M, Morabito F, Ferrarini M, Neri A, 2013: Chromosome 2p gain in monoclonal B-cell lymphocytosis and in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 88(1):24-31.

Finn WG, Kay NE, Kroft SH, Church S, Peterson LAC, 1998: Secondary Abnormalities of Chromosome 6q in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Sequential Study of Karyotypic Instability in 51 Patients. *American Journal of Hematology* 59:223–229.

Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, 1997: Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet.* 13(10):405-9.

Garimberti E, Tosi S, 2010 Fluorescence in situ hybridization (FISH), basic principles and methodology. *Methods Mol Biol.* 659:3-20.

Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, Tobin G, Åleskog A, Thunberg U, Laurell A, Sundström C, Rosenquist R, Roos G, 2005: Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 105:4807-4812.

Haidar MA, El-Hajj H, Bueso-Ramos CE, Manshour T, Glassman A, Keating MJ, Albitar M, 1996: Expression Profile of MDM-2 Proteins in Chronic lymphocytic Leukemia and Their Clinical Relevance, *American Journal of Hematology* 54:189-195.

Hallek M, Kuhn-Hallek I, Emmerich B, 1997: Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 11 (Supplement 2):39-S13.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK, 1999: Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 94:1848-1854.



Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D, Tigaud I, De Braekeleer M, Terré C, Brizard F, Callet-Bauchu E, Struski S, Veronese L, Fert-Ferrer S, Taviaux S, Lesty C, Davi F, Merle-Béral H, Bernard OA, Sutton L, Raynaud SD, Nguyen-Khac F, 2010: Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leukemia Research* 34(1):63-8.

Chen H, Treweeke AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M, Toh CH, 2000: *In vitro* and *in vivo* production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 96:3181-3187.

Chena Ch, Avalos JS, Bezares RF, Arrossagaray G, Turdo K, Bistmans A, Slavutsky I, 2008: Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *European Journal of Hematology* 81:94-99.

Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR, 1996: National Cancer Institute-Sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87:4990-4997.

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M (2005): Mechanisms of disease: chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352:804-815.

Ibbotson R, Athanasiadou A, Sutton L-A, Davis Z, Gardiner A, Baliakas P, Gunnarsson R, Anagnostopoulos A, Juliusson G, Rosenquist R, Oscier D, Stamatopoulos K, 2012: Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. *Leukemia* 26:170-172.

Jarošová M, Jedličková K, Holzerová M, Urbanová R, Papajík T, Raida L, Pikalová Z, Lakomá I, Prekopová I, Kropáčková J, Indrák K, 2001: Contribution of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization to the detection of chromosomal abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Onkologie* 24(1):60-65.

Juliusson G, Merup M, 1998: Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 25:19-26.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D, 1992: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083):818-21.

Ketley NJ, Newland AC, 1997: Haemopoietic growth factors: *Postgrad Med J* 73: 215-221.

Kim YK, Kim N, 2007: Proceeding of intronic microRNAs. *EMBO* 26:775-783.

Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S, 2002: V<sub>H</sub> mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1410-1416.

Koski T, Karhu R, Visakorpi T, Vilpo L, Knuutila S, Vilpo J., 2000: Complex chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia are associated with cellular drug and irradiation resistance. *Eur J Haematol.* 2000 Jul;65(1):32-49.

Krysov S, Dias S, Paterson A, Mockridge CI, Potter KN, Smith KA, Ashton-Key M, Stevenson FK, Packham G, 2012: Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 119(1):170-179.

Lane DP (1992): p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.

Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horenstein A, Canosso L, Mehta K, 1994: Human CD38: a glycoprotein m' search of a function. *Immunology Today* 95 Vol. 15 No. 3 1094.

Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D, 1996: Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol.* 92(2):382-8.

Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, Sala R, Cerretti R, Mandeli F, 2013: Clinical Characteristics and Outcome of Young Chronic Lymphocytic Leukemia Patients: A Single Institution Study of 204 Cases.

Mayr Ch, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner C-M, 2006: Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107: 742-751.

Montserrat E, 2004: Role of auto- and allotransplantation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 18:915-926.

Montserrat E, 2005: CLL therapy: progress at last! *Blood* 105:2-3.

Moreno C, Villamor N, Colomer D, Esteve J, Giné E, Muntanola A, Campo E, Bosch F, Montserrat E, 2006: Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107:4563-4569.

Orkin SH, Zon LI (2002): Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol.* 3(4):323-328.

Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ, 2002: Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, *IGVH* gene mutational status, and loss or mutation of the *p53* gene are independent prognostic factors. *Blood* 100(4):1177-84.

Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ, 2002: Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, *IGVH* gene mutational status, and loss or mutation of the *p53* gene are independent prognostic factors. *Blood* 100:1177-1184.

Papajík T, Jarošová M, Plachý R, Ondrák K (2006): Chronická B-lymfocytární leukemie. Část I: Pohled na původ, biologii a genetické změny leukemických buněk. *Transfúzní Hematologie dnes* 12:53-61.

Provan D, Bartlett-Pandite L, Zwicky C, Neuberger D, Maddocks A, Corradini P, Soiffer R, Ritz J, Nadler LM, Gribben JG, 1996: Eradication of polymerase chain reaction-detectable

chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood* 88:2228-2235.

Put N, Van Roosbroeck K, Konings P, Meeus P, Brusselmans C, Rack K, Gervais C, Nguyen-Khac F, Chapiro E, Radford-Weiss I, Struski S, Dastugue N, Gachard N, Lefebvre C, Barin C, Eclache V, Fert-Ferrer S, Laibe S, Mozziconacci MJ, Quilichini B, Poirel HA, Wlodarska I, Hagemeyer A, Moreau Y, Vandenberghe P, Michaux L; BCGHo and the GFCH, 2012: Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol.* 91(6):863-873.

Quintero-Rivera F, Nooraie F, Rao PN, 2009: Frequency of 5'IGH deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 190(1):33-39.

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS, 1975: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46:219-234.

Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, Davies FE, Richards SJ, Haynes AP, Russell NH, Hale G, Morgan GJ, Jack AS, Hillmen P, 2001: Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 98: 29-35.

Rozman C, Montserrat E, 1995: Chronic Lymphocytic Leukemia, Review article, *N Engl J Med*; 333:1052-1057.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Sankhavaram RP, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor MAR, Atley CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y 1995: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268:1749.

Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G, 1995: The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 4:2025.

Shiloh Y, 1997: Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Ann Rev Genet* 31:635-662.

Schaffner C, Litterst A, Liebisch P, Gilad S, Bar-Shira A, James MR, Lichter P, Döhner H, 1997: Biallelic mutations in the ATM gene in T- prolymphocytic leukemia. *Nat Med* 3:1155.

Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Döhner H, Richter P, 1999: Somatic *ATM* Mutations Indicate a Pathogenic Role of ATM in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia 94: 748-753.

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T, 1996: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273(5274):494-7.

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC, 1996: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12(4):368-75.

Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Döhner K, Ho AD, Lichter P, Döhner H, 1999: Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 13(9):1331-1334.

Strachan T, Read AP, 1999: *Human Molecular Genetics*. 2nd edition. New York: Wiley-Liss; 1999. Chapter 2 Chromosomes in cells.

Taylor AMR, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF, 1996: Leukemia and lymphoma in ataxia telangiactasia. *Blood* 87:423.

Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sällström J, Sundström Ch, Roos G, Rosenquist R, 2002: Somaticly mutated Ig VH3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99 (6):2262-2264.

Tötterman T, Nilsson K, Simonsson B, 1986: Phorbol-ester induced production of beta-2-microglobulin in B-CLL cells: relation to IgM secretory response and disease activity. *British Journal of Haematology* 62:95-103.

Urbánková H, Papajík T, Plachý R, Holzerová M, Balcárková J, Divoká M, Procházka V, Pikalová Z, Ondrák K, Jarošová M, 2012: Array-based karyotyping in chronic lymphocytic leukemia (CLL) detects new unbalanced abnormalities that escape conventional cytogenetics and CLL FISH panel.

van't Veer MB, Brooijmans AM, Langerak AW, Verhaaf B, Goudswaard CS, Graveland WJ, Lom KV, Valk PJM, 2006: The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 91:56-63.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001): Stem and progenitor cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 387-403.

Wlodarska I, Matthews C, Veyt E, Pospisilova H, Catherwood MA, Poulsen TS, Vanhentenrijk V, Ibbotson R, Vandenberghe P, Morris TC, Alexander HD, 2007: Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events. *J Mol Diagn.* 9(1):47-54.

Internetové zdroje:

<http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/IgHID40.html>

<http://www.alogo.cz/search/web/index.php?&app=probes&ch=6>

<http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-robes/hematology.html>

[http://www.dako.com/dist/ar42/p234690/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar42/p234690/prod_products.htm)

<http://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/hematology-probes.html>

<http://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/hematology-probes.html>