

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2018**

**Barbora Čudová**

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



**Chromozomální změny u chronické  
lymfocytární leukemie**

**Bakalářská práce**

**Barbora Čudová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Heleny Urbánkové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....

## Souhrn

Tato bakalářská práce s názvem Chromozomální změny u chronické lymfocytární leukemie se zabývá detekcí a významem chromozomálních aberací u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Chromozomální aberace jsme schopni detekovat pomocí klasické a molekulární cytogenetiky a některé z nich, v kombinaci s dalšími ukazateli a klinickými hodnotami, slouží jako významné prognostické markery tohoto onemocnění.

V laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky (LCG) na Hemato-onkologické klinice (HOK) Fakultní nemocnice (FN) v Olomouci bylo vyšetřeno v období 04/2017-11/2017 25 pacientů s CLL, kteří byli náhodně vybráni ze souboru pacientů ošetřovaných na HOK. U všech byla provedena klasická cytogenetická analýza a zároveň byli vyšetřeni metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) za použití panelu sond pro CLL. U pacientů byly detekovány různé změny karyotypu včetně chromozomálních změn s popsáním prognostickým významem (delece 13q14, trizomie chromozomu 12, delece genů TP53 a ATM, delece 6q21, duplikace 8q24 a přestavba genu IGH).

Nejčastěji – v 56 % případů (14 pacientů) byla detekována delece 13q14, z toho v 71 % (10 pacientů) se jednalo o monoalelickou delecii, ve 29 % (4 pacienti) o delecii jak monoalelickou, tak bialelickou. Ve 20 % případů (5 pacientů) byla detekována delece genu TP53, v 16 % případů (4 pacienti) pak delece genu ATM. Dále byla pozorována delece 6q21 v 8 % případů (2 pacienti). Trizomie chromozomu 12 byla prokázána v 8 % případů (2 pacienti). Nejméně frekventovanými změnami byly duplikace 8q24 (1 pacient) a přestavba genu IGH (1 pacient), které byly obě detekovány ve 4 % případů. U jednoho pacienta (4 %) byla nalezena duplikace oblasti 2p.

Výsledky FISH v kombinaci s klasickým cytogenetickým vyšetřením karyotypu a stanovením mutačního stavu IgVH genu, doplněné v některých případech metodou array komparativní hybridizace (arrayCGH), patří k důležitým prognostickým markerům u CLL a v kombinaci s dalšími ukazateli slouží k zařazení pacientů do rizikových skupin a přispívají ke stanovení léčebné strategie.

## Summary

This bachelor thesis entitled Chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia is focused on detection and impact of chromosomal changes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Chromosomal aberrations are detectable by classical and molecular cytogenetics and some of them, in combination with other parameters, can serve as a significant prognostic markers of this disease.

A total of 25 patients with CLL were examined in the Laboratory of Cytogenetics and Molecular Cytogenetics at the Department of Hemato-Oncology in Faculty Hospital Olomouc from April 2017 to November 2017, patients were selected randomly from a cohort of CLL patients diagnosed and treated at HOK. All of them were investigated by conventional cytogenetics and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with the CLL probe panel. Various chromosomal aberrations were detected, some of them with defined prognostic significance (deletion of 13q14, trisomy 12, deletion of ATM and TP53 genes, deletion of 6q21, duplication of 8q24 and translocation of IGH gene).

Mostly – in 56 % of cases (14 patients) the deletion of 13q14 region was found, in 71 % (10 patients) it was monoallelic deletion and in 29 % (4 patients) it was monoallelic and biallelic deletion. The deletion of TP53 gene was detected in 20 % cases (5 patients), the deletion of ATM gene was detected in 16 % cases (4 patients). The deletion of 6q21 region was observed in 8 % cases (2 patients). Trisomy 12 was confirmed in 8 % cases (2 patients). The duplication of 8q24 region (1 patient) and the translocation of the IGH gene were both detected in 4 % cases. The duplication of 2p region was demonstrated in 1 patient (4 %).

The results of the FISH method combined with a conventional cytogenetics, the IgVH gene mutation status, in some cases completed also by the arrayCGH (comparative genomic hybridization) method, belong to important prognostic markers in CLL. In combination with other indicators they are used to stratify patients into risk groups and they also assist in determination of treatment strategy.

Ráda bych poděkovala Mgr. Heleně Urbánkové, Ph.D. za čas, metodické vedení a cenné rady, které mi poskytovala při sepisování bakalářské práce, a také celému kolektivu laboratoří cytogenetiky, molekulární cytogenetiky a molekulární biologie HOK FNOL.

Práce vznikla za finanční podpory Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA UPOL) v rámci projektů LF\_2017\_007 a LF\_2018\_004 s názvem Studium molekulární a genetické podstaty nádorů krvetvorné tkáně a grantu VES16-32339A – Impact of functional polymorphisms influencing inflammation and oxidative stress on outcome and selection of treatment in chronic lymphocytic leukemia.

# Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Cíle práce .....	2
3.	Literární přehled.....	3
3.1	CLL .....	3
3.1.1	B-lymfocyty .....	3
3.1.2	Diagnostika .....	4
3.1.3	Výskyt .....	4
3.1.4	Klasifikace.....	5
3.1.5	Léčba.....	5
3.1.5.1	<i>Chemoterapie</i> .....	6
3.1.5.2	<i>Chemoimunoterapie</i> .....	6
3.1.5.3	<i>Inhibitory BCR signálu</i> .....	6
3.1.5.4	<i>BCL – inhibitory</i> .....	7
3.2	Cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření u CLL.....	7
3.2.1	Klasická cytogenetika .....	7
3.2.2	G – pruhování.....	8
3.2.3	Karyotyp.....	8
3.3	Molekulární cytogenetika CLL .....	8
3.3.1	FISH.....	9
3.3.2	mFISH.....	11
3.3.3	ArrayCGH.....	11
3.4	Prognosticky významné chromozomální změny a další biologické markery u CLL..	11
3.4.1	Delece 13q14.....	12
3.4.2	Trizomie 12 .....	12
3.4.3	Delece <i>ATM</i> .....	13
3.4.4	Delece <i>TP53</i> .....	14
3.4.5	Delece 6q21.....	14
3.4.6	Duplikace 8q24 .....	15
3.4.7	Přestavba genu <i>IGH</i> .....	15
3.4.8	Mutace <i>IgVH</i> .....	16
4.	Materiál a metody .....	17
4.1	Biologický materiál.....	17
4.2	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	17
4.2.1	Kultivace buněk periferní krve (PK).....	17
4.2.2	Kultivace buněk kostní dřeně (KD) .....	19

4.2.3	Kultivace buněk ascites.....	19
4.2.4	Zpracování biologického materiálu (BM).....	19
4.2.5	FISH.....	20
4.2.6	mFISH.....	21
4.2.7	Software .....	21
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	22
4.4	Pomůcky.....	23
4.5	Použité chemikálie a roztoky .....	23
5	Výsledky .....	26
6	Diskuze.....	38
7	Závěr .....	41
8	Literatura.....	42



## Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Princip FISH .....	9
Obrázek č. 2: Typy sond .....	10
Obrázek č. 3: Schematické znázornění translokace mezi chromozomy 14 a 18 s fúzí genů IGH/BCL2.....	16
Obrázek č. 4: Poměr pacientů na základě počtu chromozomálních změn .....	29
Obrázek č. 5: Procentuální zastoupení jednotlivých chromozomálních aberací.....	30
Obrázek č. 6: Výsledek interfázní FISH se sondou XL ATM/TP53 MetaSystems .....	33
Obrázek č. 7: Interfázní FISH se sondou XL DLEU/LAMP/12cen MetaSystems .....	33
Obrázek č. 8: Výsledek interfázní FISH se sondou XL ATM/TP53 MetaSystems .....	34
Obrázek č. 9: Výsledek FISH se sondou XL DLEU/LAMP/12cen MetaSystems. ....	34
Obrázek č. 10: Výsledek interfázní FISH se sondou XL 6q21/8q24 MetaSystems.....	35
Obrázek č. 11: Výsledek interfázní FISH se sondou XL t(14;18) IGH/BCL2 MetaSystems .....	35
Obrázek č. 12: Výsledek FISH s celochromozomovými sondami Human Chr 2 Paint, Green a Human Chr 18 Paint, Orange (MetaSystems).....	36
Obrázek č. 13: Výsledek mFISH jednoho z klonů u pacientky č. 24.....	37

## Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Dělení pacientů do jednotlivých skupin dle Binet et al.....	5
Tabulka č. 2: Rozdělení pacientů do rizikových skupin podle jednotlivých cytogenetických změn.....	12
Tabulka č. 3: Objem periferní krve pro kultivaci s IL2 a oligonukleotidy (EKAMPO MIX) podle počtu leukocytů.....	18
Tabulka č. 4: Klinická charakteristika souboru nemocných.....	27
Tabulka č. 5: Výsledky cytogenetického vyšetření a arrayCGH.....	28
Tabulka č. 6: Výsledky FISH a mFISH.....	31

# 1. Úvod

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější hematologickou malignitou dospělých v západních zemích. CLL je charakterizována klonální proliferací a akumulací neoplastických B-lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a ve slezině. Průběh onemocnění je extrémně individuální, u každého pacienta jiný – z tohoto důvodu je velmi důležité stanovení prognostických faktorů, mezi které patří zejména věk, pohlaví, mutační status IgVH genu a chromozomální změny. U většiny pacientů je onemocnění stabilní nebo s velmi malou progresí po dobu několika let. Asi u 20 % pacientů dochází po diagnóze k rychlejší progresi onemocnění a je nutné zahájit léčbu. Zařazení do prognostické skupiny je velmi důležité pro stanovení léčebného postupu. Nové léčebné strategie umožňují ve velké míře navození dlouhodobé kompletní remise onemocnění a zlepšují délku a kvalitu života pacientů s CLL.

Mezi nejvýznamnější prognostické ukazatele u CLL patří specifické chromozomální aberace: delece 13q14, trizomie chromozomu 12, delece genů TP53 a ATM, delece 6q21, duplikace 8q24 a přestavba genu IGH. Vyjmenované chromozomální změny jsme schopni detekovat metodou fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) s použitím genových a centromerických sond až u 80 % pacientů. V poslední době se za významný negativní prognostický faktor považuje i nález komplexního karyotypu, který detekujeme klasickou cytogenetikou.

V jednotlivých kapitolách se budu zabývat problematikou CLL, zejména detekcí jednotlivých chromozomálních změn u CLL.

## **2. Cíle práce**

1. Sestavení souboru pacientů s CLL.
2. Seznámení s problematikou CLL.
3. Sestavení literárního přehledu nejčastějších chromozomálních změn.
4. Určení chromozomálních změn u pacientů s CLL pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).
5. Analýza získaných dat.

### 3. Literární přehled

#### 3.1 CLL

„Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je klonální proliferace s akumulací morfologicky zralých lymfocytů, které infiltrují kostní dřeň, periferní krev, lymfatické uzliny, slezinu a také nehematopoetické orgány.“ (Anděl *et al.*, 2001).

CLL vzniká maligní transformací klonu B-lymfocytů. Tento klon sice po morfologické stránce vypadá zrale, avšak ve skutečnosti zůstal ve stádiu časného B-lymfocytu a nepokračuje dále v procesu dozrávání (Friedmann *et Vaňásek*, 1994). Také ztrácí schopnost apoptózy a může se nekontrolovatelně množit (Anděl *et al.*, 2001).

V časných stádiích dochází k tvorbě blastů v kostní dřeni, ze které jsou transportovány do periferní krve. V pozdějších stádiích dochází k infiltraci sleziny a lymfatických uzlin a konečným důsledkem je selhání krvetvorby (Anděl *et al.*, 2001).

Nástup nemoci je zpočátku velmi nenápadný. Mezi hlavní příznaky patří zvýšená únava, snížená výkonnost, malátnost, zvětšení uzlin, noční pocení, nechutenství a hubnutí (Friedmann *et Vaňásek*, 1994). Průběh choroby je u každého pacienta individuální. Přibližně u poloviny pacientů je onemocnění stabilní nebo s velmi malou progresí po desítky let. Ve většině případů nemusí být tito pacienti v době diagnózy léčeni a jsou pouze pravidelně sledováni. Asi u 20 % pacientů dochází ale po diagnóze k progresi onemocnění. Tito pacienti jsou zařazováni na základě prognostických faktorů do rizikových skupin a je u nich nezbytné zahájení terapie. U 3 - 5 % pacientů může dojít i navzdory moderní léčbě k transformaci CLL do tzv. Richterovy transformace. Toto zhoršení stavu je doprovázeno vysokými teplotami, hubnutím a progresivní lymfadenopatií. Nejčastější formou Richterovy transformace je vysoce maligní lymfom, pocházející z nediferencovaných B-lymfocytů, který navzdory léčbě vede ke smrti pacienta do 5 – 8 měsíců (Vasilj *et al.*, 2010).

##### 3.1.1 B-lymfocyty

Lymfocyty jsou buňky specifické imunity, jejímž základem je interakce antigenu s protilátkou. Lymfocyty dělíme na dvě skupiny – T-lymfocyty, které dozrávají v brzlíku (*thymus*) a B-lymfocyty, které dozrávají v kostní dřeni (*bone marrow*). Po setkání B-lymfocytu s antigenem se B-lymfocyt mění na dva typy buněk:

- a) Plazmatické buňky
- b) Paměťové buňky

Plazmatické buňky slouží k produkci protilátek (imunoglobulinů) proti danému antigenu. Antigen se váže na BCR receptor (B-cell receptor), na který se zaměřují některá léčiva proti CLL. Paměťové buňky na svém povrchu dlouhodobě nosí antigen, s nímž se už setkaly a v případě opakovaného setkání se stejným antigenem jsou schopny okamžité produkce velkého množství imunoglobulinů (Dylevský, 2009).

Imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které se skládají z lehkého (IGL) a těžkého (IGH) řetězce. Každý řetězec je tvořen konstantní a variabilní oblastí. Geny, které kódují variabilní oblast těžkého řetězce, jsou tvořeny přeskupováním V, D a J segmentů. Geny, kódující variabilní oblast lehkého řetězce pak přeskupováním segmentů V a J. Toto přeskupování segmentů je typické pro raný vývoj B-lymfocytů. Následuje jejich přesun do germinálního centra, kde může dojít k somatické hypermutaci (Chiorazzi *et al.*, 2005).

Na základě toho, jestli došlo k somatické hypermutaci, rozlišujeme mutovaný *IgVH* nebo nemutovaný *IgVH*. Mutační status *IgVH* je významným prognostickým faktorem a ovlivňuje léčbu a medián přežití.

### 3.1.2 Diagnostika

Diagnóza je stanovena na základě vyšetření krevního obrazu, kdy je podle iwCLL kritérií (International working group for CLL) pro CLL typická přítomnost více než  $5 \times 10^9/l$  klonálních B-lymfocytů (lymfocytóza). Lymfocyty mají zároveň atypickou morfolonii a specifický imunofenotypový profil. Charakteristický imunofenotyp CLL buňky je dán expresí povrchových antigenů CD5, CD19, CD20, CD23 a chybějící nebo slabou expresí FMC-7, CD22, CD79b a povrchového imunoglobulinu.

### 3.1.3 Výskyt

V západním světě je CLL nejčastějším typem leukémie u dospělých a představuje 25 % všech leukémií (Rai *et Jain*, 2016). Počty pacientů s CLL se liší napříč kontinenty. Nejvíce postižených se nachází v Austrálii, Severní Americe a v Evropě. Naopak nejméně postižených je pak v Jižní Americe a v Asii. Průměrný výskyt proto napříč regiony kolísá od 0,01 % do 0,06 % obyvatelstva (Kipps *et al.*, 2017).

Výskyt CLL se dramaticky zvyšuje s přibývajícím věkem. Toto onemocnění je velmi časté u starších lidí, s věkem nad 65 let. CLL se také dvakrát častěji vyskytuje u mužů, než u žen a muži na ni častěji umírají. Mnohem častěji postihuje bělochy, než černochoy (Redaelli *et al.*, 2004). S vyšší frekvencí se také vyskytuje u Židů ve východní Evropě. Větší riziko onemocnění hrozí také u pokrevních příbuzných pacienta s CLL.

### 3.1.4 Klasifikace

CLL rozdělujeme do rizikových skupin podle dvou základních klasifikačních (stážovacích) systémů podle Rai *et al.* (1975) a Binet *et al.* (1981). Na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci se běžně používá dělení dle Bineta, ve kterém se pacienti rozdělují do tří skupin podle toho, kolik oblastí je nemocí zasaženo. Pro klasifikaci CLL bylo vymezeno 5 základních oblastí a to:

- a) Hlava a krk
- b) Podpaží (postižení obou podpaží se počítá jako jedna oblast)
- c) Třísla (postižení obou třísel se počítá jako jedna oblast)
- d) Hmatná játra
- e) Hmatná slezina (Panovská *et Doubek*, 2013)

Dále se také sleduje, jestli pacient trpí anémií nebo trombocytopenií. Anémie neboli chudokrevnost nastává při snížení hladiny hemoglobinu pod určitou mez (Lukáš *at al.*, 2015). Trombocytopenie nastává při poklesu trombocytů – krevních destiček (Šafránková *et Nejedlá*, 2006).

Tabulka č. 1: Dělení pacientů do jednotlivých skupin dle Binet *et al.*

Skupina	Počet postižených oblastí	Medián přežití (měsíce)
<b>A</b>	Méně než 3 postižené oblasti Bez anémie a trombocytopenie	Více než 120
<b>B</b>	3 a více postižených oblastí Bez anémie a trombocytopenie	84
<b>C</b>	Žádné postižené oblasti Anémie a/nebo trombocytopenie	24

Podle závěrů posledního mezinárodního mítinku o CLL (iwCLL 2017) zůstávají systémy podle Raie a Bineta stále platné, mezi relevantní přídatné prognostické markery je ale nutno zařadit mutační stav *IgVH*, sérovou  $\beta 2m$ , přítomnost del (17p) a/nebo mutace *TP53* a komplexní karyotyp (Hallek, 2017).

### 3.1.5 Léčba

U pacientů, kteří se řadí podle klasifikace do skupiny 1 podle Raie nebo do skupiny A podle Bineta a trpí časným stádiem onemocnění, platí, že nevyžadují léčbu a jsou pouze

sledování (Panovská *et* Doubek, 2013). Avšak pokud se nemoc začne rozvíjet nebo se objeví symptomy nemoci, je pacientům doporučena léčba. Mezi hlavní příznaky progresu nemoci patří splenomegalie, nebo pokud se lymfocyty v periferní krvi zdvojnásobí za méně, než jeden rok.

Při volbě terapie se musí brát na zřetel několik důležitých činitelů, jako je věk nad 65 let, přítomnost dalších nemocí (komorbidita), delece (17p), mutace *TP53*, přítomnost komplexního karyotypu a mutační stav *IgVH*.

Léčba pacientů s CLL může zahrnovat pouze chemoterapii, chemoterapii s imunoterapií nebo léčiva, která cílí na signální dráhy CLL buněk, které ovlivňují jejich růst a přežití (Kipps *et al.*, 2017).

### **3.1.5.1 Chemoterapie**

Chemoterapie byla hojně využívána v posledních 50 letech. Používala se k ní především alkylační agens nebo purinová analoga. Mezi alkylační agens řadíme chlorambucil, cyklofosfamid a bendamustin. Mezi purinová analoga pak fludarabin, pentostatin a kladribin (Kipps *et al.*, 2017). Chlorambucil a bendamustin se využívají při léčbě pacientů s komorbiditami (Eichhorst *et al.*, 2011). Chemoterapie může zvýšit riziko infekcí, ale také díky ní může vzniknout sekundární nádorové onemocnění, jako například akutní myeloidní leukemie (Kipps *et al.*, 2017).

### **3.1.5.2 Chemoimunoterapie**

Chemoimunoterapie je kombinací chemoterapie s monoklonálními protilátkami, jako je rituximab, obinutuzumab nebo ofatumumab. Tato kombinace se jeví jako výhodná. Pacienti, kteří jsou léčeni chemoimunoterapií vykazují vyšší míru odpovědi na léčbu a delší medián přežití, než ti, kteří jsou léčeni pouze chemoterapií. Chemoimunoterapie je také vhodná pro pacienty starší než 65 let s různými komorbiditami. Nejčastěji se používá kombinace fludarabin + cyklofosfamid + rituximab (FCR) a bendamustin + rituximab (BR). Kombinace BR se používá u pacientů bez předchozí léčby a bez delece (17p). U pacientů, kteří jsou léčeni kombinací FCR se však s vyšší mírou vyskytuje neutropenie a infekce, než u pacientů, léčených kombinací BR (Kipps *et al.*, 2017).

### **3.1.5.3 Inhibitory BCR signálu**

Mezi inhibitory BCR signálu řadíme BTK inhibitory, P13K inhibitory a SYK inhibitory (Kipps *et al.*, 2017). Zástupcem BTK inhibitorů je ibrutinib, který se využívá při léčbě pacientů



starších 65 let, bez delece (17p). Mezi vedlejší účinky užívání ibrutinibu patří únava, průjem, vyrážka a zvýšený krevní tlak (O'Brian *et al.*, 2014).

Hlavním zástupcem P13K inhibitorů je idelalisib, který se většinou aplikuje spolu s rituximabem. Pacienti léčení touto kombinací mají prokazatelně vyšší míru odpovědi a delší medián přežití. Idelalisibem jsou léčeni pacienti v relapsu onemocnění (Kipps *et al.*, 2017).

#### **3.1.5.4 BCL – inhibitory**

Nejznámějším BCL-2-inhibitorem je venetoclax. Ten inhibuje protein BCL-2, čímž je navozena apoptóza CLL buněk. Venetoclax se používá u pacientů s relapsem a s delecí (17p) (Kipps *et al.*, 2017).

## **3.2 Cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření u CLL**

### **3.2.1 Klasická cytogenetika**

Klasická cytogenetika se zabývá studiem chromozomů a stanovením karyotypu. Vyžaduje přítomnost chromozomů ve stádiu metafáze, což bylo v minulosti u CLL problematické vzhledem k nízké proliferační aktivitě neoplastických B-lymfocytů *in vitro*. V současnosti se tento problém řeší použitím stimulace B-lymfocytů pomocí interleukinu 2 (IL2) a CpG oligonukleotidů DSP30. Další nevýhodou klasické cytogenetiky je velmi nízké rozlišení (5 –10 Mb), které závisí na kvalitě a morfologii chromozomů. Z tohoto důvodu se k doplnění nálezu klasické cytogenetiky využívá molekulární cytogenetika (viz kapitola 3.3 Molekulární cytogenetika CLL).

Základní součástí cytogenetického vyšetření je pruhování, které umožňuje odlišení jednotlivých chromozomových párů na základě specifických světlých a tmavých proužků, v závislosti na typu chromatinu. Existují dva typy chromatinu. Prvním typem je heterochromatin, který je velmi kondenzovaný, tudíž je dobře barvitelný a viditelný. Heterochromatin se ve velké míře nachází v oblasti centromery a neobsahuje žádné aktivní geny, je transkripčně neaktivní. Druhým typem je euchromatin, který je transkripčně aktivní – nachází se v něm geny, které se transkribují. Euchromatin je rozvolněný, z čehož vyplývá, že se slabě barví (Benner *et Ness*, 2014). Pro každý chromozom je rozložení pruhů typické. Byla ustanovena mezinárodní nomenklatura ISCN (International system for human cytogenetic nomenclature), podle níž má každý chromozom ramena p (krátká) a q (dlouhá), která jsou rozdělena do oblastí a podoblastí a jsou číslována směrem od centromery k telomerám. To

umožňuje přesnou identifikaci změn na chromozomu (Lexová *et al.*, 2000). Dále chromozomy charakterizuje jejich velikost a poloha centromery. Rozlišujeme několik pruhovacích technik, mezi které patří R-pruhování, Q-pruhování, C-pruhování, NOR-barvení a v současnosti asi nejvíce používané G-pruhování.

### 3.2.2 G – pruhování

G – pruhování je nejrozšířenější a nejpoužívanější metoda barvení chromozomů. Vzorek je vystaven působení trypsinu, který denaturuje proteiny chromozomů. Tyto proteiny jsou následně obarveny Giemsovým barvivem. Tmavě jsou obarveny heterochromatinové oblasti bohaté na adenin a thymin, světle pak euchromatin, bohatý na guanin a cytosin (Lexová *et al.*, 2000). Hodnocení probíhá ve světelném mikroskopu, kdy jsou vyhledány mitózy, které jsou pomocí CCD (couple charged device) kamery a speciálního softwaru nasnímány a následně karyotypovány.

### 3.2.3 Karyotyp

Karyotyp je charakteristika všech chromozomů v jádře buňky. Sestavuje se z důvodů zjištění různých chromozomálních aberací a to z jakékoliv tělní buňky. V hemato-onkologické praxi se ovšem nejčastěji používají leukocyty, které jsou kultivovány v kultivačním médiu a stimulovány k dělení. Ve stádiu metafáze se chromozomy zafixují, obarví a uspořádají podle velikosti do párů. Karyotyp člověka má za normální situace celkem 46 chromozomů, z toho 22 párů autozomů a 1 pár gonozomů (Lexová *et al.*, 2000). Normální karyotyp ženy je 46, XX a muže 46, XY. Při kancerogenezi vznikají specifické chromozomální změny, které mají přímou souvislost s daným hemato-onkologickým onemocněním. Jsou používány pro upřesnění diagnózy, stanovení prognózy, určení léčby a sledování její úspěšnosti, detekci výskytu minimální reziduální choroby a případně relapsu onemocnění.

Při výskytu tří a více nesouvisejících klonálních chromozomálních aberací, ať už numerických či strukturních, pak hovoříme o komplexním karyotypu (Baliakas *et al.*, 2014).

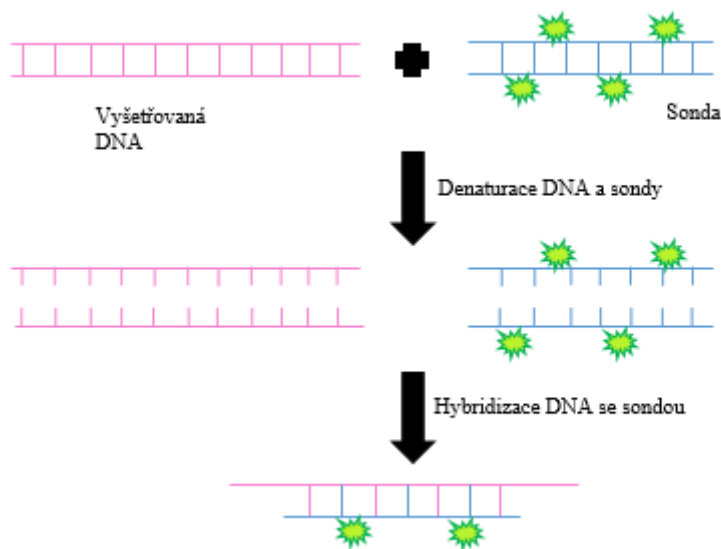
## 3.3 Molekulární cytogenetika CLL

Vedle klasické cytogenetiky patří mezi hlavní metodu, pomocí které jsou určovány chromozomální aberace u CLL fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Použitím této molekulárně cytogenetické metody jsme schopni stanovit předem definované chromozomální změny. V některých případech je vhodné k doplnění a upřesnění nalezených chromozomálních

aberrací doplnit FISH o mnohobarevnou fluorescenční *in situ* hybridizaci (mFISH) a array-komparativní genomickou hybridizaci (arrayCGH).

### 3.3.1 FISH

FISH, neboli fluorescenční *in situ* hybridizace je metoda, která se používá k detekci chromozomálních aberrací, k identifikaci genů, které jsou spojovány s různými genetickými onemocněními a ke zkoumání mechanismu vzniku aberrací (Gray *et al.*, 1994). Pomocí speciální fluorescenční DNA sondy jsme schopni detekovat konkrétní místa v genomu (Werner *et al.*, 1997). Nejdříve dojde k denaturaci DNA, kdy se dvojitá DNA rozpadne na jednovláknovou. Po přidání DNA sondy a následné inkubaci dojde k navázání DNA sondy ke komplementárním sekvencím na jednovláknové DNA. Následuje odmytí nenavázané nebo slabě navázané DNA sondy. Hotový preparát se pozoruje pod fluorescenčním mikroskopem a analyzuje se za pomoci speciálního softwaru (Trask *et al.*, 1990).



Obrázek č. 1: Princip FISH

Tato metoda umožňuje sledování konkrétních genů nebo oblastí chromozomů nejen na mitózách, ale i v interfázních jádrech. Dokáže určit i velmi malé chromozomální aberace, které nelze stanovit klasickou cytogenetikou. Běžně jsou používány kombinace dvou nebo tří různě fluorescenčně značených sond.

Sondy pro FISH dělíme na:

**a) Centromerické**

Tyto sondy hybridizují se specifickými repetitivními sekvencemi, které se nachází v oblasti centromery. Používají se především pro zjištění numerických aberací (Lexová *et al.*, 2000).

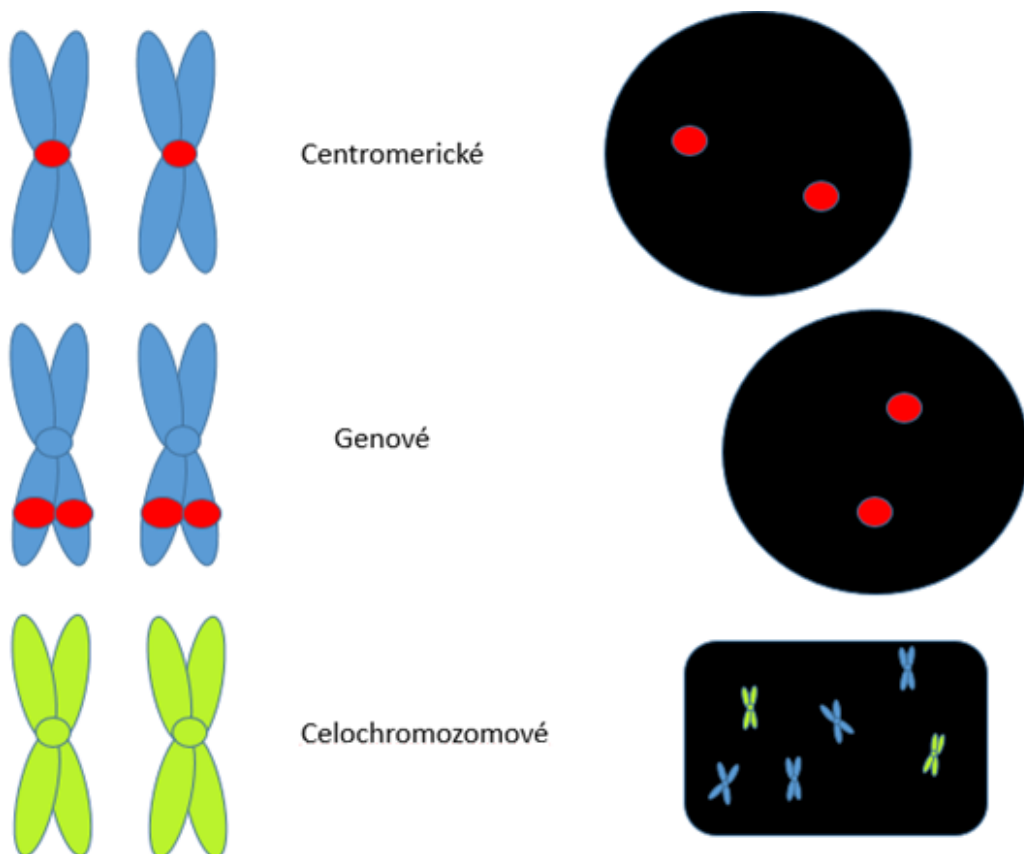
**b) Genové (lokusově specifické)**

Genové sondy hybridizují s určitými geny na chromozomech. Vzájemně se od sebe liší svou velikostí (Lexová *et al.*, 2000).

**c) Subtelomerické a telomerické - specifické pro subtelomerické a telomerické oblasti jednotlivých chromozomů**

**d) Malovací sondy pro celé chromozomy**

Vznikají smícháním jednotlivých sond pro celý chromozom. Dané sondy jsou označeny stejným fluorochromem (Pritchard *et Korf*, 2007). Pomocí těchto sond jsme schopni detekovat různé strukturální přestavby, jako například translokace mezi různými chromozomy.



Obrázek č. 2: Typy sond

### 3.3.2 mFISH

Speicher *et al.* (1996) vyvinuli metodu zvanou mFISH, která umožňuje v jednom hybridizačním pokusu obarvit různými barvami všech 22 párů autozomů i pohlavní chromozomy X a Y v lidském karyotypu. Metoda používá 24 rozdílných DNA sond, které jsou označeny 5 odlišnými fluorochromy nebo jejich kombinacemi, které jsou specifické pro každý chromozomový pár. Na hybridizovaný preparát je postupně nasnímán pomocí šesti fluorescenčních filtrů a kamery, obraz se poté analyzuje speciálním softwarem, který složí jednotlivé fluorescenční obrazy do jednoho, skutečně barevného obrazu. Těmto skutečným barvám se přiřadí tzv. pseudobarvy, které jsou pro lidské oko snadněji rozeznatelné. Citlivost metody závisí na přítomnosti a kvalitě chromozomů v metafázi a pohybuje se od 1 do 2,5 Mb. Metoda mFISH je vhodná zejména k určení původu marker chromozomů a komplexních změn karyotypu, ale není schopna detekovat drobné intrachromozomové přestavby. Postup přípravy vzorků je stejný, jako u klasické FISH.

### 3.3.3 ArrayCGH

ArrayCGH je metoda, která se vyvinula z již existující metody CGH (komparativní genomová hybridizace). ArrayCGH využívá místo metafázních chromozomů sekvence DNA, které jsou navázány na mikroskopickém sklíčku (čipu). Díky této metodě můžeme rychle analyzovat změny počtu kopií jednotlivých sekvencí DNA. Metoda je založena na izolaci nádorové DNA, která je označena fluorochromem. Dále je třeba kontrolní genomová DNA označená jiným fluorochromem. Tyto značené DNA jsou následně hybridizovány na sklíčko se sekvencemi DNA. Porovnáním poměru fluorescence jednotlivých fluorochromů můžeme detekovat změny počtu kopií sekvencí DNA (Adam *et al.*, 2008).

## 3.4 Prognosticky významné chromozomální změny a další biologické markery u CLL

Mezi nejčastější cytogenetické změny detekované u CLL patří delece 13q14 (55 %), trizomie chromozomu 12 (16 %), delece genů TP53 (7 %) a ATM (18 %), delece 6q21 (6 %), duplikace 8q24 a přestavba genu IGH. Různé změny mají různý prognostický vliv na diagnózu pacienta.

Tabulka č. 2: Rozdělení pacientů do rizikových skupin podle jednotlivých cytogenetických změn

Riziko	Cytogenetická změna	Medián přežití (měsíce)	Četnost onemocnění (%)
Nízké	delece 13q	133	55
Střední	trizomie 12, normální karyotyp a FISH	114, 111	16
Vysoké	delece 11q nebo mutace <i>ATM</i>	79	18
Velmi vysoké	delece 17p nebo mutace <i>TP53</i>	32	7

Převzato z: Dohner *et al.*, 2000, Kozák, 2008, Puiggros *et al.*, 2014

### 3.4.1 Delece13q14

Delece oblasti 13q14 je nejběžnější cytogenetická abnormalita, která se vyskytuje u více než 50 % pacientů s CLL. Obecně je spojována s příznivou prognózou (Puiggros *et al.*, 2014). Medián přežití je 133 měsíců (Kozák, 2008). Velikost deletované oblasti je značně variabilní. Důsledkem delece velkých částí oblasti 13q14 je kratší medián přežití (Ouillette *et al.*, 2011). Pro charakterizaci delece oblasti 13q14 byly navrženy dva orientační body. Prvním je minimální deletovaná oblast (MDR), zahrnující gen *DLEU2*, mikroRNA *miR15-a* a *miR16-1* a první exon genu *DLEU1*. Druhým je gen *RB1* – gen pro retinoblastom – který je lokalizován na pruzích 13q14.1 a 13q14.2. Delece tohoto genu slouží jako marker delece 13q s velkými chromozomálními ztrátami (Dal Bo *et al.*, 2011). *MiR15-a* a *miR16-1* mají funkci tumorového supresoru, nicméně, tyto oblasti nejsou vždy zahrnuty do deletované oblasti 13q a u některých pacientů je jejich exprese pouze snížena (Puiggros *et al.*, 2014).

V 30 % případů CLL se vyskytuje bialelická delece 13q. Bialelické delece jsou většinou malé a nezahrnují gen *RB1*. Někteří autoři tvrdí, že bialelická delece je více agresivní, než monoalelická, jiní, že nejsou rozdíly v klinických výsledcích mezi monoalelickou a bialelickou delecí (Chena *et al.*, 2008, Puiggros *et al.*, 2014).

### 3.4.2 Trizomie 12

Ačkoliv se léta předpokládalo, že trizomie chromozomu 12 je nejčastější chromozomální aberací u CLL, Döhner *et al.* (2000) prokázali, že trizomie chromozomu 12 se vykytuje u 16 % pacientů s CLL a je tak druhou nejčastější aberací. Patří do prognostické skupiny středního rizika, kdy medián přežití je 114 měsíců (Kozák, 2008). Trizomie chromozomu 12 se nejčastěji vyskytuje jako samostatná cytogenetická změna, ale kromě toho může být také spojena s ostatními aberacemi, jako je trizomie 18, trizomie 19, delece 13q, 14q, 11q nebo 17p a translokace genu *IGH*. Buňky s trizomií 12 jsou morfoloicky odlišné od normálních buněk

(Puiggros *et al.*, 2014). Medián přežití je vyšší v případě, že trizomie 12 je jediná cytogenetická změna (Han *et al.*, 1984).

Jelikož postiženou oblastí není malá oblast na chromozomu, ale chromozom celý, je velmi obtížné určit kandidátní geny, které by mohly být zodpovědně za onemocnění CLL. Trizomie 12 je spojena s upregulací genů, které se nacházejí podél celého chromozomu, jako jsou např. *HIP1R* nebo *MDM2*. Gen *MDM2* je zapojen v degradaci *TP53*, takže jeho overexprese může vést k deregulaci buněčného cyklu. Markerem silně asociovaným s trizomií 12 je také gen *NOTCH1*, jehož mutace jsou spojeny s progresí onemocnění (Puiggros *et al.*, 2014).

### 3.4.3 Delece *ATM*

Gen *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) je lokalizován na chromozomu 11 v oblasti q23. Delece této části chromozomu se vyskytuje přibližně u 10 – 20 % pacientů, kteří ještě nepodstoupili léčbu, avšak u pacientů, kteří podstoupili chemoimunoterapii se četnost zvyšuje až na 40 % (Jiang *et al.*, 2016). U 11q- pacientů je ovšem gen *ATM* deletován v 8 – 30 %, což naznačuje, že při delecí 11q u CLL hrají roli i jiné geny, např. gen *BIRC3*. *BIRC3* se nachází v těsné blízkosti genu *ATM* v oblasti 11q22 (Puiggros *et al.*, 2014).

Velikost delece je velmi variabilní a ve většině případů je větší, než 20 Mb. Rozlišujeme velké a malé (atypické) delece. Velké delece se vyskytují ve většině případů CLL, oproti tomu malé delece nejsou tak časté a jsou spojovány především s mutacemi *ATM*. Gen *ATM* se nachází uvnitř místa minimální delece (MDR), které zahrnuje oblasti 11q22.3 – 23.1. V MDR se nachází také další geny, jako jsou např. *RDX*, *FRDX1*, *MRE11* a *BIRC3* (Puiggros *et al.*, 2014). Pacienti, kteří mají deletované nebo mutované obě alely *ATM* ztrácí funkci *ATM*, oproti tomu při monoalelické mutaci *ATM* může být jeho funkce zachována. Gen *ATM* je zodpovědný za autozomálně recesivní onemocnění Ataxia telangiectasia, které se projevuje progresivní neurodegradací, imunodeficiencí a predispozicí k rakovině lymfatického systému (Navrkalová *et al.*, 2013).

*ATM* je protein kináza, která hraje klíčovou roli při odpovědi na poškození DNA po rozpoznání dvouvláknového zlomu. Dochází k fosforylaci mnoha cílů, mezi které patří i protein *TP53*. Transkripční odpověď na dvouvláknový zlom DNA je zcela závislá na *ATM* a pouze malá část se přenáší na cestu proteinu *TP53*, což vede k pro-apoptotické signalizaci (Navrkalová *et al.*, 2013).

Delece nebo mutace genu *ATM* je znakem nepříznivé prognózy pro pacienta. Medián přežití je 79 měsíců (Kozák, 2008).

#### 3.4.4 Delece *TP53*

Delece 17p13 se vyskytuje u 3 – 8 % pacientů s CLL a je spojována s velmi špatnou prognózou s krátkým mediánem přežití – 32 měsíců (Puiggros *et al.*, 2014, Kozák, 2008). Nepříznivá prognóza je spojena se zvýšenou expresí CD38, ZAP-70 a nemutovaným *IgVH* (Puiggros *et al.*, 2014). Gen *TP53* hraje důležitou roli v řadě podstatných mechanismů buňky, jako je zastavení buněčného cyklu, apoptóza nebo senescence. *TP53* je označován jako nádorový supresor a je nejčastěji mutovaným genem při rakovině (Zenz *et al.*, 2010).

U CLL je většina defektů *TP53* bialelická, kdy např. dochází k deleci *TP53* na jedné alele a k mutaci *TP53* na druhé alele. Přibližně 30 % všech defektů *TP53* tvoří mutace *TP53* bez delece 17p. Oproti tomu delece 17p bez přítomnosti mutace *TP53* je méně frekventovaná a tvoří jen asi 10 % všech defektů *TP53* (te Raa *et al.*, 2016). Pacienti s bialelickým defektem mají kratší medián přežití a horší klinické výsledky, než ti, kteří mají monoalelickou změnu (Puiggros *et al.*, 2014).

Pacienty s 17p- můžeme rozdělit do dvou skupin, a to podle toho, jestli delece 17p vznikla *de novo* nebo jako sekundární změna. Pacienti, u kterých vznikla delece 17p *de novo* mají medián přežití 4 – 4,5 let. Avšak mnohem častější je vznik delece 17p jako sekundární změna během klonální evoluce a pacienti mají snížený medián přežití na 1 – 1,5 roku (Puiggros *et al.*, 2014).

Nefunkčnost genu *TP53* může být navozena overexpresí MDM2, což je specifická ubikvitin ligasa, která zprostředkovává degradaci *TP53*. U 50 – 70 % pacientů s defektem *TP53* se vyskytuje zvýšená exprese tohoto enzymu (Puiggros *et al.*, 2014).

#### 3.4.5 Delece 6q21

Delece dlouhého raménka chromozomu 6 (6q) se u CLL vyskytuje s relativně nízkou četností, a to 3 – 6 %. Nejčastěji se jedná o sekundární chromozomální změnu nebo se tato delece vyskytuje v rámci komplexního karyotypu (Cuneo *et al.*, 2004).

Mezi kandidátní geny v deletované oblasti 6q21 patří např. gen *FOXO3*, transkripční faktor hrající důležitou roli v procesu apoptózy. Jarošová *et al.*, (2017) prokázali sníženou hladinu exprese tohoto genu u pacientů s delecí 6q.

U pacientů s delecí 6q21 bylo prokázáno vyšší množství leukocytů, splenomegalie, atypická morfologie lymfocytů a přítomnost molekuly CD38. Delece 6q21 je spojena se střední prognózou a kratší dobou přežití (Cuneo *et al.*, 2004).



V oblasti 6q21 se nachází RMD2 (region minimální delecce), který bývá deletován u různých lymfoproliferativních onemocnění. Na chromozomu 6 se nachází ještě dva další regiony minimální delecce, a to RMD1 v oblasti 6q24 – 6q27 a RMD3 v oblasti 6q23 (Taborelli *et al.*, 2005).

#### 3.4.6 Duplikace 8q24

V oblasti 8q24 se nachází onkogen *MYC*. Duplikace tohoto onkogenu se vyskytuje asi u 5 % pacientů s CLL (Fonseka *et Tirado*, 2015). *MYC* je transkripční faktor, který kontroluje buněčný cyklus, růst, diferenciaci, apoptózu a biosyntézu. Aberantně exprimovaný *MYC* má pravděpodobně za následek nerovnováhu mezi přežitím buňky a apoptózou (Put *et al.*, 2012). Duplikaci *MYC* řadíme mezi nepříznivé faktory.

Velmi vzácně také dochází k translokaci *MYC*. I když jsou translokace *MYC* typické spíše pro jiná onemocnění, např. Burkittův lymfom, v některých případech dochází k translokacím i u CLL. Nejčastějšími translokacemi jsou: t(8;14), t(8;22) a t(2;8) (Huh *et al.*, 2008). Translokace *MYC* bývá často asociována s progresí onemocnění nebo s transformací do jiného, agresivnějšího onemocnění (Put *et al.*, 2012).

Často byly translokace pozorovány spolu se špatnými prognostickými markery, jako jsou CD38+, komplexní karyotyp, a ztráta *ATM* a *TP53* (Put *et al.*, 2012).

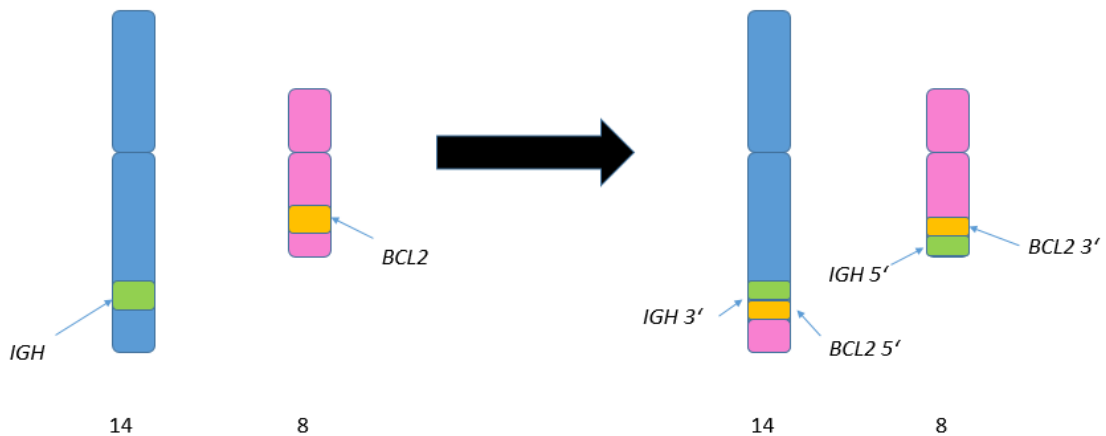
#### 3.4.7 Přestavba genu *IGH*

Gen *IGH* se nachází na chromozomu 14 v oblasti q32. Jeho přestavba není častá a dochází k ní u přibližně 5 % případů CLL. V důsledku translokací různých genů jako např. *BCL2* (18q21), *BCL3* (19q33), *CCND1* (11q13), *MYC* (8q24) nebo *BMI1* (10p11) do blízkosti transkripčně aktivních promotorů genu *IGH* dochází k deregulaci těchto genů (de Braekeleer *et al.*, 2016).

Translokace *IGH/BCL2* se často vyskytuje v rámci komplexního karyotypu. Díky této translokaci dochází k overexpresi genu *BCL2*, což má za následek blokaci apoptotické dráhy některých buněk, např. lymfocytů. Translokace *IGH/BCL3* se vyskytuje jako samostatná změna velmi vzácně. Gen *BCL3* je overexprimován a je spuštěna signální dráha, která vede k inhibici apoptózy (de Braekeleer *et al.*, 2016).

Translokace genu *IGH* jsou obecně spojeny se špatnou prognózou.

Dále může docházet k delecí nebo parciální delecí variabilního segmentu *IGH* (5'konce). To je považováno za fyziologický stav a dochází k němu při přeskupování V-D-J segmentů (Berkova *et al.*, 2008).



Obrázek č. 3: Schematické znázornění translokace mezi chromozomy 14 a 18 s fúzí genů *IGH/BCL2*

### 3.4.8 Mutace *IgVH*

Mutační status *IgVH* a procento CD38+ CLL buněk je významným prognostickým faktorem (Damle *et al.*, 1999). Pokud je gen pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu mutován, znamená to lepší prognózu. Mutace genu pro *IgVH* je nalezena přibližně u 50 % pacientů s CLL. Pokud je *IgVH* nemutován, znamená to rychlou progresi onemocnění (Kozák, 2008).

U pacientů s nemutovaným *IgVH* se častěji vyskytují CD38+ B-lymfocyty, než u pacientů s mutovaným *IgVH*. Pacienti s nemutovaným *IgVH* špatně odpovídají na chemoterapii a mají kratší medián přežití. Naopak pacienti s mutovaným genem pro *IgVH* chemoterapii potřebují jen minimálně nebo vůbec a medián přežití je delší (Damle *et al.*, 1999). Nemutovaný *IgVH* je asociován s přítomností nepříznivých chromozomálních aberací, především s delecí 11q, zahrnující gen *ATM*, ale také s inaktivací genu *TP53* (Trbusek *et al.*, 2006).

## **4. Materiál a metody**

### **4.1 Biologický materiál**

Pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření nejčastěji používáme periferní krev (PK), dále pak kostní dřev (KD) nebo uzlinu (U), méně často jiný materiál (např. ascites). U všech pacientů byla pro kultivaci buněk použita PK, kromě pacienta č. 16, u kterého byla použita KD, a pacienta č. 25, u kterého byly kultivovány buňky získané z ascites.

### **4.2 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

Kultivace buněk KD, PK, nebo ascites a zpracování materiálu pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření bylo prováděno podle SOP (standardních operačních postupů), které se používají v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci.

Biologický materiál se odebírá za sterilních podmínek do sterilních zkumavek s heparinem a transportuje se do laboratoře. Pak je zpracován buď přímo (pouze pro vyšetření FISH) nebo je nejdříve kultivován a teprve následně zpracován pomocí fixačního roztoku. Takto připravené buňky můžeme použít jak pro klasickou cytogenetiku, tak pro metodu FISH. Postup kultivace závisí na typu materiálu.

Vzorky pacientů jsou během vyšetření uchovávány v ledničce při 4 °C, následně jsou archivovány při -20 °C.

#### **4.2.1 Kultivace buněk periferní krve (PK)**

1. Připravíme si kultivační médium s EKAMPO MIX (IL2 a oligonukleotidy). Do každé kultivační nádoby s médiem přidáme PK podle počtu lymfocytů (viz Tabulka č. 3).
2. Směs umístíme do termostatu při 37 °C po dobu 72 hodin.
3. Po 48 hodinách kultivace přidáme do kultivační nádoby 28 µl kolcemidu a kultivujeme dalších 24 hodin.

Tabulka č. 3: Objem periferní krve pro kultivaci s IL2 a oligonukleotidy (EKAMPO MIX) podle počtu leukocytů

Počet leukocytů	Objem krve (ml)	Počet leukocytů	Objem krve (ml)
5	2,000	40	0,250
6	1,670	41	0,244
7	1,430	42	0,238
8	1,250	43	0,233
9	1,110	44	0,227
10	1,000	45	0,222
11	0,910	46	0,217
12	0,830	47	0,213
13	0,770	48	0,208
14	0,710	49	0,204
15	0,670	50	0,200
16	0,630	51	0,196
17	0,590	52	0,192
18	0,560	53	0,189
19	0,530	54	0,185
20	0,500	55	0,182
21	0,480	56	0,179
22	0,450	58	0,172
23	0,430	60	0,167
24	0,420	62,5	0,160
25	0,400	65	0,154
26	0,380	67,5	0,148
27	0,370	70	0,143
28	0,360	72,5	0,138
29	0,340	75	0,133
30	0,330	77,5	0,129
31	0,320	80	0,125
32	0,313	82,5	0,121
33	0,303	85	0,118
34	0,294	87,5	0,114
35	0,286	90	0,111
36	0,278	92,5	0,108
37	0,270	95	0,105
38	0,263	97,5	0,103
39	0,256	100	0,100

#### **4.2.2 Kultivace buněk kostní dřene (KD)**

1. KD odebraná do odběrových zkumavek se omyje od heparinu.
2. KD přelijeme do 15ml centrifugačních zkumavek a doplníme do 15 ml médiem RPMI-1640.
3. Směs promícháme a centrifugujeme při 188 g po dobu 10 minut.
4. Centrifugát přeneseme do kultivační nádoby s BM médiem.
5. Ke kultivaci přidáme 28  $\mu$ l kolcemidu a inkubujeme při 37 °C po dobu 24 hodin.

#### **4.2.3 Kultivace buněk ascites**

1. Postupujeme stejně jako při kultivaci KD.

#### **4.2.4 Zpracování biologického materiálu (BM)**

1. Smísením metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 připravíme fixační roztok Carnoye.
2. Obsah kultivačních nádob přelijeme do 15ml centrifugačních zkumavek a centrifugujeme 10 minut při 188 g a při 37 °C.
3. Odstraníme supernatant a přidáme 10 ml 0,075mol/l roztoku KCl vytemperovaného na 37 °C.
4. Po dobu 25 minut probíhá inkubace při 37 °C.
5. Přidáme 1 kapku vychlazeného fixačního roztoku Carnoye, promícháme a centrifugujeme 10 minut při 188 g a při 37 °C.
6. Odstraníme supernatant, přidáme 10 ml vychlazeného fixačního roztoku Carnoye.
7. Směs inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě.
8. Následně ji centrifugujeme 10 minut při 188 g při 4 °C.
9. Odstraníme supernatant, přidáme 10 ml fixačního roztoku Carnoye a promícháme pomocí vortexu.
10. Kroky 8 a 9 opakujeme tak dlouho, dokud nemá buněčná suspenze mléčné zabarvení.

#### 4.2.5 FISH

1. Suspenzi buněk nakapeme na podložní sklo a necháme uschnout.
2. Hustotu buněk na podložním skle zkontrolujeme pod mikroskopem.
3. Podložní sklo s nakapanými buňkami vložíme do roztoku 2x SSC na 10 minut.
4. Sklo odvodníme v alkoholové řadě s 70%, 80%, 90% a 96% etanolem po dobu 2 minut.
5. Sklo necháme usušit na vyhřáté plotýnce při 45 °C.
6. Mezitím si připravíme sondy, které necháme rozmraznout, zvortexujeme je a zcentrifugujeme je.
7. Na podložní sklo se suspenzí buněk pipetujeme 10 µl sondy a přikryjeme krycím sklíčkem o velikosti 24x24 mm.
8. Okraje krycího sklíčka zalepíme rubber-cementem, aby nedošlo k vysychání vzorku.
9. Probíhá denaturace při 75 °C po dobu 2 minut.
10. Následně sklo vyjmeme a necháme inkubovat ve vlhké komůrce do druhého dne při 37 °C.
11. Druhý den vytáhneme podložní sklo s buňkami z inkubátoru, sloupneme krycí sklíčko a rubber-cement a vložíme do horké lázně (73 °C) s 0,4xSSC + 0,3% NP40 na 2 minuty.
12. Poté přemístíme sklo do 2xSSC + 0,1% NP40, který má pokojovou teplotu na 2 minuty.
13. Sklo usušíme na plotýnce při 45 °C.
14. Pipetujeme 10 µl DAPI a přikryjeme krycím sklíčkem.

Pro vlastní vyšetření byly použity genové sondy od firmy MetaSystems, kdy každý genový lokus je označen jiným fluorochromem (FITC, spectrum orange, popřípadě spectrum aqua). Součástí CLL panelu jsou v laboratoři molekulární cytogenetiky HOK následující sondy:

- XL IGH Plus MetaSystems – přestavba genu pro IGH je znázorněna tím, že dochází k oddělení oranžového a zeleného signálu pokrývajícího konstantní a variabilní oblast genu IGH.
- XL ATM/TP53 MetaSystems – zeleně značená oblast odpovídá oblasti, ve které se nachází gen ATM, oranžově značená oblast pak místu výskytu genu TP53
- XL DLEU/LAMP/12cen MetaSystems – gen DLEU se nachází v oblasti 13q14 a je zobrazován oranžově, centromera chromozomu 12 je zobrazována zeleně. Gen LAMP se nachází v oblasti 13q34 a je zobrazován modře.
- 6q21/8q24 MetaSystems – oranžově značená je specifická oblast 6q21 obsahující gen SEC63. Zeleně je značena oblast 8q24, obsahující gen MYC.

Pro doplňující vyšetření byly dále použity celochromozomové sondy a sonda pro mFISH.

#### 4.2.6 mFISH

##### Příprava preparátu:

1. Na podložní sklo nakapeme 20 µl buněčné suspenze a necháme uschnout.
2. Sklo inkubujeme 20 minut v termostatu při 37 °C.
3. Sklo promyjeme v sestupné řadě alkoholů (96%, 90%, 80%, 70%), v každém po dobu 1 minuty.
4. Přeneseme jej do koplíny s 0,1xSSC na 1 minutu.
5. Sklo vložíme na 30 minut do 2xSSC, které je v 70°C vodní lázni.
6. Koplínu se sklem vyjmeme a chladíme 20 minut ve vodní lázni při 37 °C.
7. Vložíme jej na 1 minutu do roztoku 0,1xSSC o laboratorní teplotě.
8. Po dobu 1 minuty sklo denaturujeme v 0,07mol/l NaOH při laboratorní teplotě.
9. Sklo přeneseme do 0,1xSSC na 1 minutu při 4 °C, poté do 2xSSC na 1 minutu při 4 °C.
10. Provedeme odvodnění ve vzestupné řadě ledových alkoholů (70%, 80%, 90%, 96%), v každém po dobu 1 minuty.
11. Sklo přeneseme na vytemperovanou plotýnku a necháme uschnout při 45 °C.

##### Příprava sondy:

12. Do 0,2ml mikrozkušavky napipetujeme 8 µl sondy.
13. V termocykleru proběhne denaturace při teplotě 75 °C po dobu 5 minut, následuje ochlazení na 10 °C na 30 sekund.
14. Sonda se inkubuje 30 minut při 37 °C.

##### Hybridizace:

15. Denaturovanou sondu napipetujeme na sklo s buňkami a přikryjeme krycím sklíčkem (22x22 mm).
16. Okraje sklíčka oblepíme rubber-cementem.
17. Hybridizujeme po dobu 24 hodin při 37 °C.
18. Další den odmyjeme zbytek nenávané sondy v 0,4xSSC ve vodní lázni o teplotě 72 °C po dobu 2 minut a v 2xSSC/0,05% Tween20 při laboratorní teplotě po dobu 30 sekund.
19. Sklo usušíme a pipetujeme 10 µl DAPI a přikryjeme krycím sklíčkem (24x24 mm).

#### 4.2.7 Software

Pro vytvoření karyotypu jsem použila software IKAROS od firmy MetaSystems, pro hodnocení FISH a mFISH software ISIS.

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

CCD kamera

Centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Heraeus Holding)

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

Flowbox HERAsafe® (Heraeus Holding)

Fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus)

Inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant)

Inkubátor ThermoBrite (Abbott Molecular)

Lednička

Metafer Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss)

Mraznička

Software Ikaros (MetaSystems)

Software ISIS (MetaSystems)

Stolní minicentrifuga C1301 (Labnet)

Světelný mikroskop Olympus BX60 (Olympus)

System pro dělení chromozomů v metafázi Hanabi (ADSTEC Corporation)

PCR cykler ProFlex (Life Technologies)

Topná a sušící deska Medax (Nagel)

Třepačka Heidolph Reax top (Heidolph)

Vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International)



## 4.4 Pomůcky

BM médium (Biological Industries)

Centrifugační zkumavky Falcon (15 ml), (Thermo Fisher Scientific)

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

Fixogum Rubber Cement (Marabu)

Imerzní olej (Olympus)

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

Pasteurovy pipety (10 ml), (Biosigma)

Pipety

Plastové kultivační láhve (40 ml), (Thermo Fisher Scientific)

Podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific)

Špičky

## 4.5 Použité chemikálie a roztoky

0,075mol/l KCl (lékárna FNOL)

20xSSC (lékárna FNOL)

96% etanol (lékárna FNOL)

DAPI (Abbott Molecular, kat. č. 06J49-001)

dH<sub>2</sub>O (HOK)

Fluorescenčně značené sondy (MetaSystems): XL IGH BA (kat. č. D-5107-100-OG), XL CLL Kit (kat. č. D-5044-100-TC), 6q21/8q24 (kat. č. D-5039-100-OG), Human Chr 1 Paint, Orange (kat. č. D-0301-100-OR), Human Chr 2 Paint, Green (kat. č. D-0302-100-FI), Human Chr 5 Paint, Orange (kat. č. D-0305-100-OR), Human Chr 9 Paint, Green (kat. č. D-0309-100-FI), Human Chr 18 Paint, Orange (kat. č. D-0318-100-OR), XL t(14;18) *IGH/BCL2* DF (kat. č. D-5113-100-OG), 24 XCyte mFISH Kit (kat. č. D-0125-060-DI)

Fluorescenčně značené sondy (Abbott): Vysis CEP 2 (D2Z1) Spectrum Orange Probe (kat. č. 06J36-027), Vysis CEP 18 (D18Z1) Spectrum Green Probe (kat. č. 05J10-018).

Hydroxid sodný (Sigma Aldrich, kat. č. 1310-73-2)

Karyomax Colcemid (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 15212012)

Kyselina octová (Lach-Ner, kat. č. 10047-A80)

Metanol (Lach-Ner, kat. č. 20038-AT0)

NP40 (Abbott Molecular, kat. č. 07J05-001)

RPMI-1640 médium (Sigma Aldrich, kat. č. R0883)

Tween 20 (Sigma Aldrich, kat. č. 9005-64-5)

### **Příprava roztoků**

#### **0,4xSSC/0,3% NP40:**

20 ml 20xSSC

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 laboratorní teplotě

#### **20xSSC:**

132 g 20xSSC

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

pH 7, uchovávat při laboratorní teplotě

#### **2xSSC/0,1% NP40:**

100 ml 20xSSC

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 laboratorní teplotě

#### **2xSSC:**

50 ml 20xSSC

450 ml injekční H<sub>2</sub>O

pH 7 – 7,5, uchovávat při laboratorní teplotě

**0,1xSSC:**

2,5 ml 20xSSC

497,5 ml injekční H<sub>2</sub>O

**0,4xSSC:**

10 ml 20xSSC

490 ml injekční H<sub>2</sub>O

**2xSSC/0,05% Tween 20:**

5 ml 20xSSC

45 ml injekční H<sub>2</sub>O

25 µl Tween20

**1mol/l NaOH:**

40 g NaOH rozpustit v 1 l injekční H<sub>2</sub>O

**0,07mol/l NaOH:**

14 ml 1mol/l NaOH

186 ml injekční H<sub>2</sub>O

**90% ethanol:**

94 ml 96% ethanol

6 ml injekční H<sub>2</sub>O

**80% ethanol:**

83 ml 96% ethanol

17 ml injekční H<sub>2</sub>O

**70% ethanol:**

73 ml 96% ethanol

27 ml injekční H<sub>2</sub>O

## 5 Výsledky

V období od dubna 2017 do listopadu 2017 jsem vyšetřila metodou FISH celkem 25 pacientů s CLL diagnostikovaných nebo léčených na HOK FNOL. Z celkového počtu 25 pacientů bylo 12 mužů (48 %) a 13 žen (52 %). Věkové rozmezí se pohybovalo od 42 let do 87 let a průměrný věk v době diagnózy činil 65 let. Z celkového počtu 25 pacientů se 10 pacientů (40 %) nacházelo ve stádiu A podle Bineta, 8 pacientů (32 %) ve stádiu B a 4 pacienti (16 %) ve stádiu C (u 3 pacientů nebylo stádium dle Bineta určeno). Pět nemocných (20 %) bylo vyšetřeno v době diagnózy. Dvacet pacientů (80 %) už bylo na HOK sledováno dříve (doba sledování od 3 do 132 měsíců), z toho 16 pacientů (64 %) už bylo léčených (viz Tabulka č. 4: Klinická charakteristika souboru nemocných).

Vyšetření bylo provedeno metodou FISH za použití panelu uvedených specifických genových a centromerických sond u všech 25 pacientů. Pro zpřesnění výsledků jsem u 2 pacientů použila také celochromozomové sondy (WCP) a u 3 pacientů metodu mFISH. Výsledky metody FISH, kterou jsem prováděla, byly u každého pacienta doplněny vyšetřením klasické cytogenetiky, dále metodou arrayCGH (Cytogenetická laboratoř HOK FNOL) (viz Tabulka č. 5) a mutačního stavu *IgVH* (Laboratoř molekulární biologie HOK FNOL) (viz Tabulka č. 4).

Tabulka č. 4: Klinická charakteristika souboru nemocných

Číslo pacienta	Pohlaví	Věk	Vyšetření v době dg.	Doba sledování (měsíce)	Materiál	Stádium dle Bineta	IgVH status
1	M	42	N	125	PK	A	mut
2	M	70	N	131	PK	C	nemut (VH3-7)
3	Ž	69	N	113	PK	C	nemut (VH3-74)
4	M	69	N	100	PK	-	-
5	Ž	76	N	4	PK	C	nemut (VH3-21)
6	M	75	N	14	PK	B	nemut
7	Ž	66	A	-	PK	B	nemut (VH1-69)
8	Ž	72	N	7	PK	A	mut
9	Ž	57	A	-	PK	A	mut
10	Ž	75	N	43	PK	A	nemut (VH4-39)
11	Ž	64	A	-	PK	A	mut
12	Ž	81	A	-	PK	A	mut
13	Ž	75	N	71	PK	B	nemut
14	M	68	N	33	PK	B	nemut (VH1-69)
15	Ž	79	N	70	PK	B	nemut (VH1-69)
16	M	60	N	67	KD	-	-
17	M	66	N	40	PK	B	mut
18	M	87	A	-	PK	A	mut
19	M	74	N	3	PK	A	-
20	M	83	N	44	PK	-	nemut
21	M	44	N	31	PK	B	-
22	Ž	76	N	33	PK	A	mut
23	Ž	71	N	83	PK	B	nemut (VH1-69)
24	Ž	60	N	132	PK	A	nemut (VH3-15)
25	M	79	N	88	ascites	C	nemut

Legenda: M = muž, Ž = žena, N = ne, A = ano, PK = periferní krev, KD = kostní dřev, mut = mutovaný, nemut = nemutovaný

#### VÝSLEDKY KLASICKÉ CYTOGENETIKY A arrayCGH:

Klasické cytogenetické vyšetření karyotypu bylo provedeno u 24 pacientů (u jednoho nebylo možné klasickou cytogenetiku provést, z důvodu nedostatku biologického materiálu). U 22 pacientů bylo vyšetření úspěšné a byl určen karyotyp, zatímco u 2 pacientů nebyly získány kultivací žádné buňky ve stádiu metafáze. U 14 pacientů byl detekován normální karyotyp, u 8 pacientů (32 %) byly nalezeny chromozomální změny.

Metoda arrayCGH k doplnění výsledků FISH a klasické cytogenetiky byla provedena u 12 pacientů. U všech pacientů nalezené změny potvrzují výsledky interfázní FISH s CLL panelem sond, navíc však detekují u 6 pacientů změny, které interfázní FISH s CLL panelem nezachytila. U pacientky č. 9 byly nalezeny metodou arrayCGH dvě malé delece v oblastech 13q14.2 a 13q14.3, které se ale nepodařilo metodou FISH prokázat, použitá sonda pokrývá větší oblast.

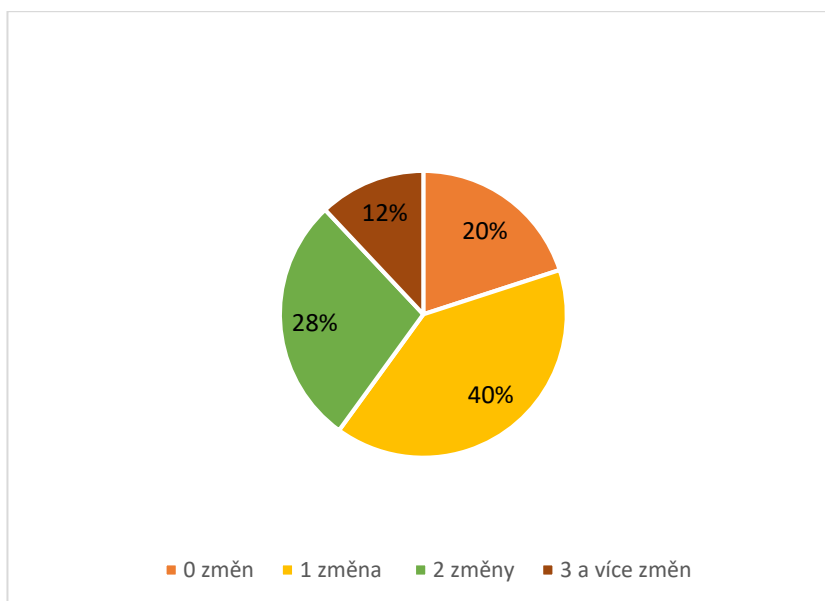
Tabulka č. 5: Výsledky cytogenetického vyšetření a arrayCGH

Číslo pacienta	Cytogenetické vyšetření	Výsledek ArrayCGH
1	NÚ	N
2	46,XY[2]	ND
3	46,XX,?der(22)[9]/46,XX[1]	N
4	46,XY,del(11)(q)[3]/ 46,XY,del(6)(q),del(11)(q)[3]/ 46,XY[3]	ND
5	45,XX,der(2),der(3),-17[6]/ 46,XX,?del(17)(p?) [3]/ 46,XX[3]	ND
6	46,XY[26]	ND
7	46,XX[30]	N
8	46,XX,del(17)(p)[3]/ 46,XX[26]	arr[GRCh37] 17p13.3p11.2(1693_19361321)
9	46,XX[30]	arr[GRCh37] 13q12.11q34(21348952_115064542)x2 hmz,13q14.2(50604150_50753059)x0,13q14.3(50998767_51278514)x0,13q32.2q32.3(99051082_99510515)x3~4,13q32.3(99789237_100139046)x3
10	46,XX[26]	arr[GRCh37] 3q24q25.32(142924211_158392226)x2 hmz,10q22.3q23.1(79386908_83837703)x2 hmz,11q12.3(62330293_62815662)x1,13q14.2q14.3(47445304_52244517)x1,13q14.3q21.2(54697502_59729075)x2 hmz
11	46,XX[13]	arr[GRCh37] 13q14.2q14.3(50604150_51423054)x1
12	46,XX[21]	N
13	46,XX[1]	arr[GRCh37] 6q16.1q26(97422368_164387954)x1,8q23.1q24.3(107025536_146230967)x3,13q14.11q21.31(45196648_63390155)x1,13q14.2q14.3(48879210_51394051)x0
14	46,XY[20]	arr[GRCh37]?2p25.3p11.1(17,019-92,072,301)x3,?6p25.3p24.3(132,043-8,040,808)x3,11q22.3q23.3(106,560,095-117,646,858)x1,18p11.32p11.21(64,847-14,158,122)x1
15	46,XX,del(11)(q)[6]/ 46,XX[7]	arr[GRCh37] 11q14.2q24.1(86555689_123715671)x1,13q14.2q14.3(49689907_51933894)x1
16	46,XY[30]	N
17	46,XY,-18,+mar[5]/ 46,XY[5]	arr[GRCh37] 21q21.2q22.3(25036672_48090317)x3
18	46,XY[20]	arr[GRCh37] 13q14.2q14.3(50500134_51394051)x1
19	46,XY[27]	ND
20	47,XY,+12[1]/ 47,XY,-8,+12,+mar1[4]/ 47,XY,-8,+12,+mar2[4]/ 46,XY[7]/ 45,X,-Y[3]	arr[GRCh37]11q14.1q23.3(81646760-117705666)x1,(12)x3,?18p11.31(2762786-3153981)x3,?22q13.32(49371757-50065733)x3
21	46,XY[25]	N
22	46,XX[10]	ND
23	NÚ	arr[GRCh37] 10q22.2(75,203,584-77,327,559)x1,10q23.2q23.33(89,272,424-94,829,179)x1,10q24.32q25.1(103,095,813-105,939,677)x1,10q26.12q26.13(122,198,512-123,802,815)x1,13q14.2q14.3(48,458,908-52,244,517)x1,18q12.3(38,465,951-41,333,004)x2 hmz,21q21.3q22.11(29,513,918-33,104,957)x2 hmz,22q12.3q13.31(36,304,142-44,739,310)x2 hmz
24	46,XX,?add(1)(p),?der(5),?der(9),-11,-13,-16,-18,+4mar[cp8]/ 46,XX[3]	ND
25	ND	ND

Legenda: NÚ = neúspěšné, N = normální nález, ND = neprovedeno

## VÝSLEDKY FISH S CLL PANELEM SOND:

Metodou FISH jsem vyšetřila u všech 25 pacientů tyto aberace: delece 13q14, trizomie chromozomu 12, delece genů TP53 a ATM, delece 6q21, duplikace 8q24 a přestavba genu IGH. U všech pacientů bylo toto vyšetření úspěšné. U 5 nemocných (20 %) nebyla prokázána žádná chromozomální změna, u 10 nemocných (40 %) jedna chromozomální změna, u 7 nemocných (28 %) dvě chromozomální změny a u 3 nemocných (12 %) tři a více chromozomálních změn (viz Obrázek č. 4).

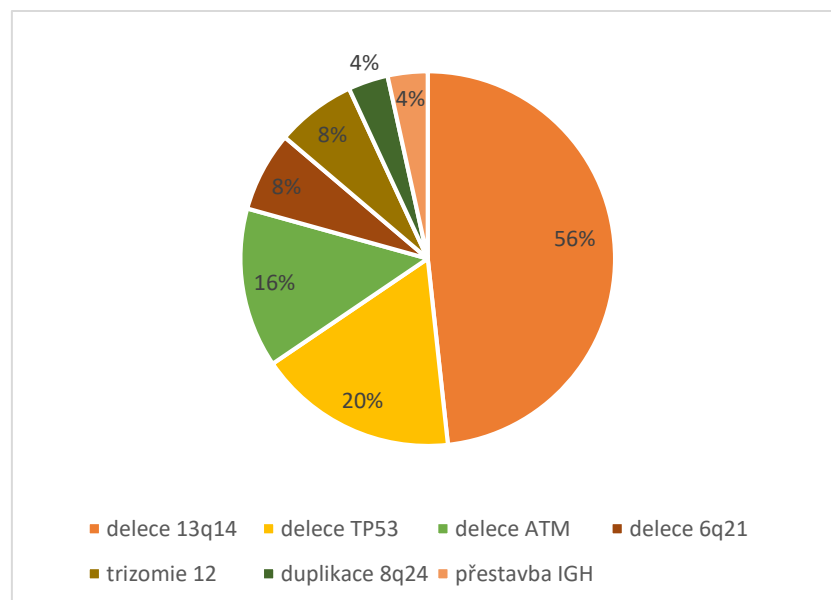


Obrázek č. 4: Poměr pacientů na základě počtu chromozomálních změn

Výsledky interfázni FISH s CLL panelem sond jsou přehledně uvedeny v Tabulce č. 6.

Nejčastěji – v 56 % případů (14 pacientů) byla detekována delece 13q14. U 10 pacientů (71 %) byla tato delece monoalelická, 4 pacienti (29 %) měli jak monoalelickou, tak bialelickou deleci. U 7 pacientů se spolu s delecí 13q14 vyskytovala i jiná chromozomální změna. Jako druhá nejčastěji pozorovaná změna byla delece genu TP53 – vyskytovala se ve 20 % případů (5 pacientů). U dvou pacientů se jednalo o jedinou chromozomální změnu, u dalších tří byla tato změna spojena ještě s jinou aberací. Třetí nejčastější změnou byla delece genu ATM, která byla pozorována u 16 % nemocných (4 pacienti). U všech se vyskytovala společně s další chromozomální změnou. Dále byla pozorována delece 6q21 v 8 % případů (2 pacienti).

Trizomie chromozomu 12 byla prokázána v 8 % případů (2 pacienti), normální nález u 92 % případů (23 pacientů). U obou postižených se vyskytovala spolu s jinou chromozomální změnou. Duplikace 8q24 byla nalezena ve 4 % případů (1 pacientka). U této pacientky byly pozorovány ještě další chromozomální změny. Přestavba genu IGH byla detekována ve 4 % případů (1 pacient), u kterého se vyskytovala translokace chromozomů 14 a 18 (*IGH/BCL2*) U 2 pacientů (8 %) byla zjištěna pouze jedna kopie genu IGH. U 5 pacientů (20 %) byla detekována delece 5'konce genu (variabilní oblast). Tato delece je považována za fyziologickou. Jeden pacient měl jak deletovanou 5' koncovou oblast genu, tak chybějící jednu kopii genu (viz Obrázek č. 5).



Obrázek č. 5: Procentuální zastoupení jednotlivých chromozomálních aberací



Tabulka č. 6: Výsledky FISH a mFISH

Číslo pacienta	FISH								mFISH
	IGH	ATM	TP53	13q14	c12	6q21	8q24	další	
1	N	N	N	N	N	N	N	-	ND
2	DEL 4 %	N	N	9%	N	N	N	-	ND
3	FD 52 %	N	9%	N	N	N	N	-	ND
4	N	94%	N	88%	N	17%	N	-	ND
5	N	N	9%	N	N	N	N	KK	45,XX,t(2;12;5)(q?21;q?24;p?13),der(3)t(3;17)(p?25;q?21),der(10)t(10;12)(q?22;?), -17[31]/ 44,XX,dic(3;18)(p?11;q?11),der(3)t(3;17)(p?25;q?21),der(10)t(10;12)(q?22;?), -17[7]/ 46,XX[1]
6	N	N	N	93%	N	N	N	-	ND
7	FD 71 %	N	N	10%	N	N	N	-	ND
8	N	N	25%	N	N	N	N	-	ND
9	N	N	N	N	N	N	N	-	ND
10	N	N	N	92%	N	N	N	-	ND
11	N	N	N	69%	N	N	N	-	ND
12	N	N	N	6%	N	N	N	-	ND
13	N	N	6%	58 % MD, 6 % BD	N	82%	82%	-	ND
14	FD 49 %	54%	N	N	N	N	N	-	ND
15	FD 95 %	86%	N	95%	N	N	N	-	ND
16	N	N	N	N	N	N	N	-	ND

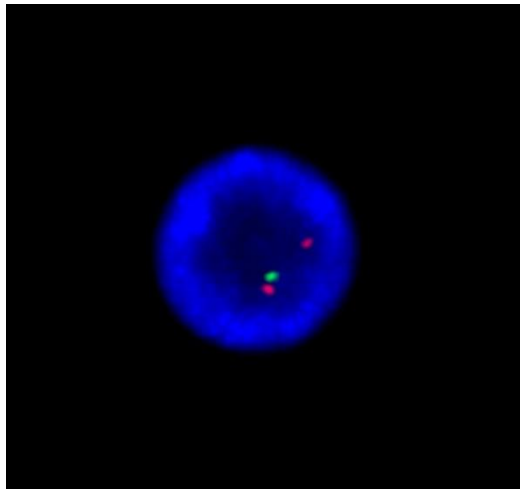
Legenda: N = normální nález, FD = fyziologická delece, MD = monoalelická delece, BD = bialelická delece, KK = komplexní karyotyp, ND = neprovedeno, DEL = delece, PŘEST = přestavba

Pokračování Tabulka č. 6: Výsledky FISH a mFISH

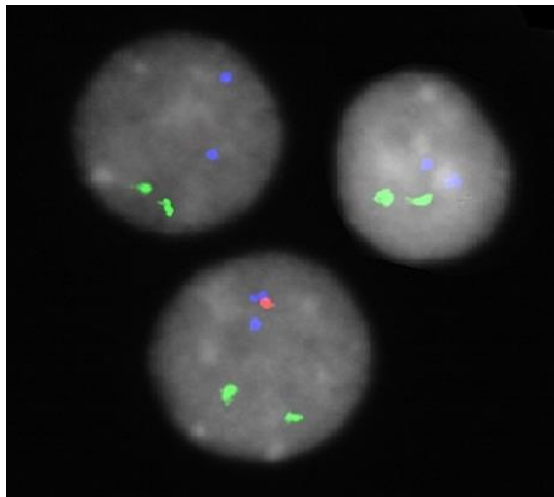
Číslo pacienta	FISH								mFISH
	IGH	ATM	TP53	13q14	c12	6q21	8q24	další	
17	N	N	N	N	N	N	N	der(18)t(2;18)(q?14;q?2?)	ND
18	N	N	N	42 % MD, 3 % BD	N	N	N	-	ND
19	N	N	8%	59 % MD, 8 % BD	N	N	N	-	ND
20	N	13%	N	N	16%	N	N	KK	47,XY,+12[9/24]/47,XY,der(8)t(4;8)(?;?p),+12[4/24]/47,XY,+del(12)(q?), der(19)t(12;19)(q?;?)[3/24]/46,XY[8/24]
21	N	N	N	N	N	N	N	KK	46,XY,del(11)(q22),der(15)t(8;15)(q24;p?12)[3]/46,XY,del(11)(q22)[3]
22	N	N	N	54 % MD, 24 % BD	N	N	N	-	ND
23	FD 72 %, DEL 9 %	N	N	83%	N	N	N	-	ND
24	NL	N	N	26%	N	N	N	KK	46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21)t(9;22)(q?;q?12), der(9)t(9;13)(q?21;q?13),der(13)t(1;13)(?;q?13)ins(13;9)(q?13;?), der(18)t(9;18)(?;p?11.2)[5]/46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34), der(9)t(X;9)(q?25;p?21)t(9;22)(q?;q?12),t(9;13)(q?21;q?13),der(18)t(9;18)(?;p?11.2) [5]/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]
25	PŘEST 41 %	N	N	N	39%	N	N	t(14;18)	ND

Legenda: N = normální nález, FD = fyziologická delece, MD = monoalelická delece, BD = bialelická delece, KK = komplexní karyotyp, ND = neprovedeno, DEL = delece, PŘEST = přestavba

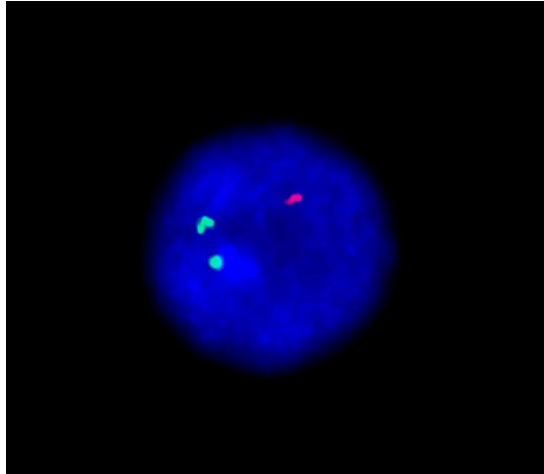
PŘÍKLADY JEDNOTLIVÝCH VÝSLEDKŮ FISH:



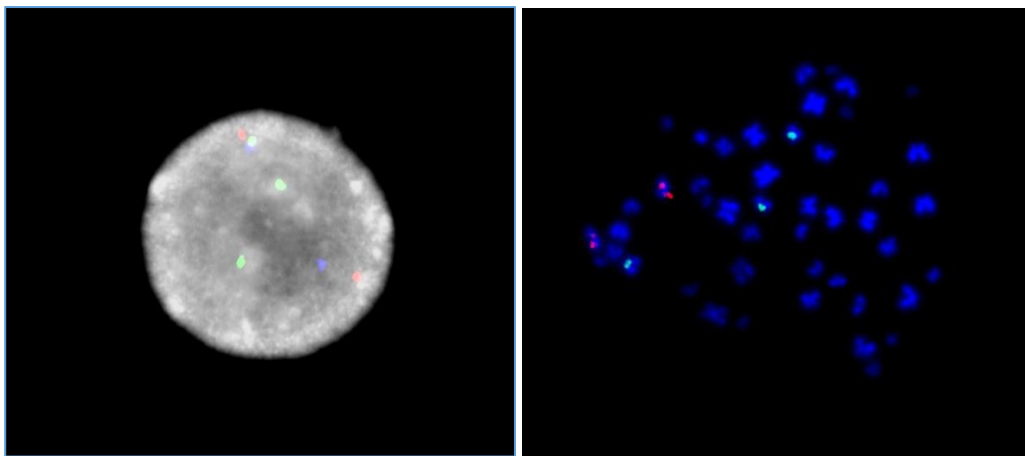
Obrázek č. 6: Výsledek interfázní FISH se sondou XL ATM/TP53 MetaSystems znázorňuje delecí genu ATM u pacientky č. 15. Červeně značená sonda pokrývá oblast genu TP53 (17p13) a zelená hybridizuje k oblasti genu ATM (11q22). Přítomnost pouze jednoho zeleného signálu prokazuje delecí genu ATM.



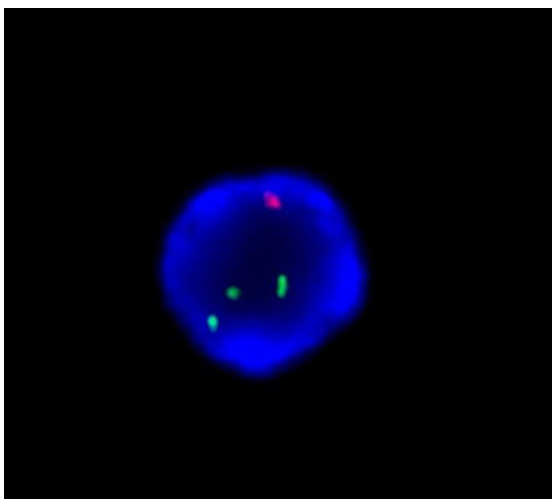
Obrázek č. 7: Interfázní FISH se sondou XL DLEU/LAMP/12cen MetaSystems znázorňuje monoalelickou a bialelickou delecí 13q14 u pacienta č. 18. Červeně značená je sonda pokrývající oblast 13q14 (DLEU1, DLEU2), zelená sonda hybridizuje k centromerické oblasti chromozomu 12 a modrá k oblasti 13q34 (LAMP). Přítomnost pouze jednoho červeného signálu značí monoalelickou delecí 13q14, žádný červený signál svědčí pro bialelickou delecí.



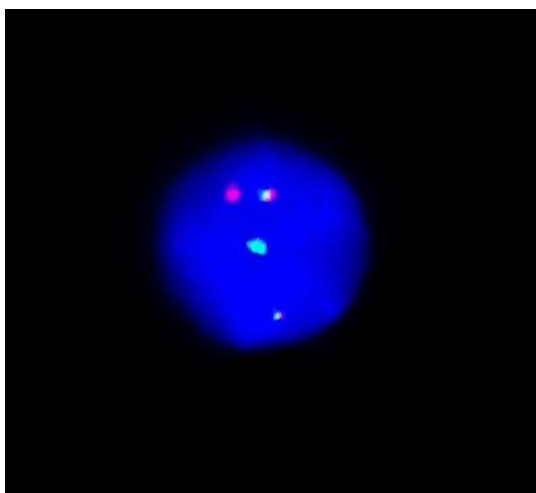
Obrázek č. 8: Výsledek interfázní FISH se sondou XL ATM/TP53 MetaSystems. Červeně značená sonda pokrývá oblast genu TP53 (17p13) a zelená hybridizuje k oblasti genu ATM (11q22). Přítomnost pouze jednoho červeného signálu prokazuje delecí genu TP53 u pacientky č. 5.



Obrázek č. 9: Výsledek FISH se sondou XL DLEU/LAMP/12cen MetaSystems. Trizomie chromozomu 12 byla prokázána v 16 % interfázních buněk (levá část obrázku) a v 70 % mitóz (pravá část obrázku) pacienta č. 20. Červeně značená je sonda pokrývající oblast 13q14 (DLEU1, DLEU2), zelená sonda hybridizuje k centromerické oblasti chromozomu 12 a modrá k oblasti 13q34 (LAMP). Tři zelené signály prokazují trizomii chromozomu 12.



Obrázek č. 10: Výsledek interfázní FISH se sondou XL 6q21/8q24 MetaSystems. Červená část sondy hybridizuje k oblasti 6q21, zelená k oblasti 8q24. Přítomnost pouze jednoho červeného signálu značí delecí oblasti 6q21 (SEC63), zatímco tři zelené signály svědčí pro duplikaci genu MYC (8q24) u pacientky č. 13.



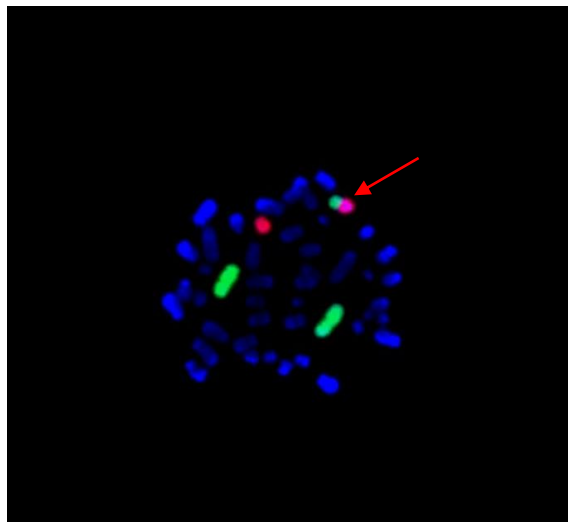
Obrázek č. 11: Výsledek interfázní FISH se sondou XL t(14;18) IGH/BCL2 MetaSystems. Červená část sondy hybridizuje k oblasti 18q21 (BCL2) a zelená k oblasti 14q32 (IGH). Přítomnost dvou fúzních červeno-zelených signálů svědčí pro reciproknou translokaci t(14;18)(q21;q32) s fúzí genů BCL2/IGH u pacienta č. 25.

## DALŠÍ CHROMOZOMÁLNÍ ZMĚNY U VYBRANÝCH PACIENTŮ NEZACHYCENÉ CLL PANELEM SOND:

U pacienta č. 17 byla v cytogenetickém vyšetření prokázána změna karyotypu:

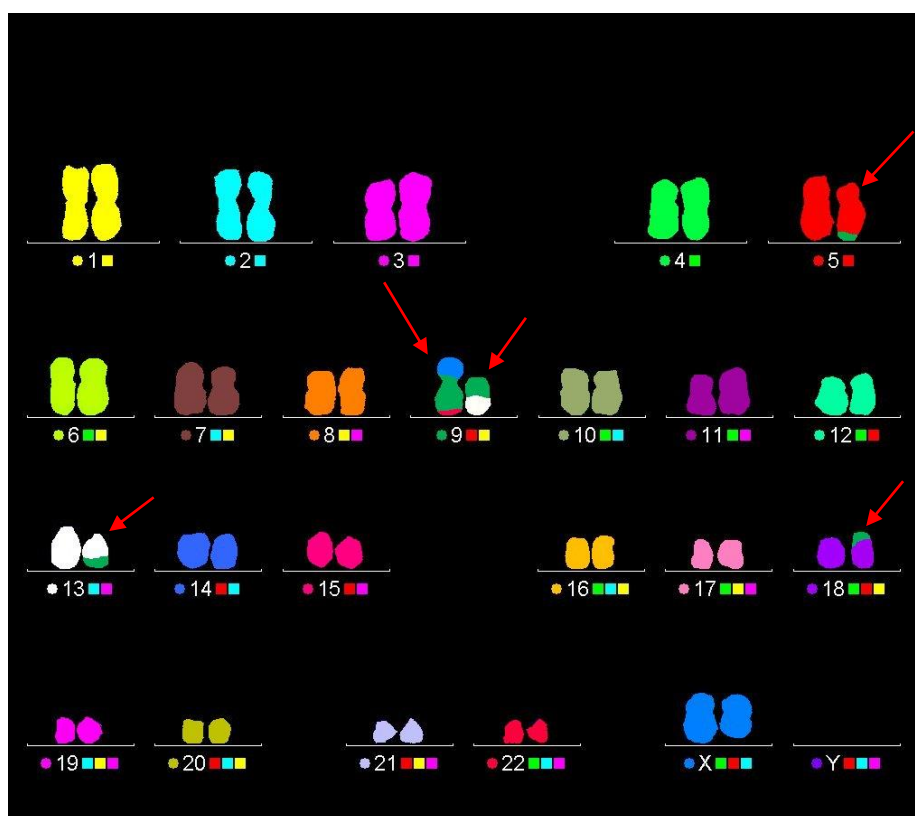
46,XY,-18,+mar[5]/46,XY[5].

Pomocí interfázní FISH s CLL panelem sond ale nebyla žádná chromozomální aberace detekována. K upřesnění původu marker chromozomu jsem použila celochromozomové sondy pro chromozom 2 a 18 Human Chr 2 Paint, Green a Human Chr 18 Paint, Orange (MetaSystems) a prokázala jsem duplikaci části chromozomu 2 a její translokaci na derivovaný chromozom 18. Dále jsem použila centromerické sondy pro chromozomy 2 a 18, abych vyloučila, že se jedná o dicentrický chromozom. Závěrečný karyotyp byl na základě kombinace výsledků klasické cytogenetiky a FISH stanoven takto: 46,XY,der(18)t(2;18)(q?14;q2?).



Obrázek č. 12: Výsledek FISH s celochromozomovými sondami Human Chr 2 Paint, Green a Human Chr 18 Paint, Orange (MetaSystems). Šipka ukazuje na derivovaný chromozom 18 nesoucí duplikovaný materiál chromozomu 2 u pacienta č. 17.

Pacientka č. 24 měla již z předchozích vyšetření v LCG HOK detekovaný komplexní karyotyp, který byl prokázán i v tomto odběru. Nalezené chromozomové změny se shodují s výsledky vyšetření z roku 2015, navíc však byla prokázána přítomnost dalšího nového klonu, který kromě původních aberantních chromozomů nese navíc der(13)t(1;13)(?;q?13)ins(13;9)(q?13;?). Tento nález svědčí pro klonální vývoj onemocnění.



Obrázek č. 13: Výsledek mFISH jednoho z klonů u pacientky č. 24 s karyotypem: 46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21)t(9;22)(q?;q?12),der(9)t(9;13)(q?21;q?13),der(13)t(1;13)(?;q?13)ins(13;9)(q?13;?),der(18)t(9;18)(?;p?11.2).

## 6 Diskuze

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je lymfoproliferativní onemocnění, které vzniká maligní transformací klonu B-lymfocytů. CLL je nejčastější typ leukemie u dospělých a její výskyt výrazně roste s přibývajícím věkem (Rai *et al.*, 2016). Nejčastěji postižení jsou lidé s věkem nad 65 let (Redaelli *et al.*, 2004).

Pacienti vyšetření v období od dubna do listopadu roku 2017 v LCG HOK FN Olomouc se pohybovali ve věkovém rozmezí 42 – 87 let a jejich průměrný věk činil v době diagnózy 65 let. To odpovídá literatuře, protože Redaelli *et al.* (2004) uvádí, že medián věku při diagnóze se pohybuje od 64 let do 70 let. Z celkového počtu 25 pacientů bylo 12 mužů (48 %) a 13 žen (52 %) (1:1), což literatuře neodpovídá, jelikož Redaelli *et al.* (2004) uvádí, že CLL se vyskytuje dvakrát častěji u mužů, než u žen. Rozdíl je dán malým počtem pacientů v mém souboru a omezeným časovým obdobím.

CLL je onemocnění s velmi heterogenním průběhem, ke včasnému určení prognózy a stanovení léčby mimo jiné přispívá i určení chromozomálních aberací se zdokumentovaným prediktivním významem. Metodou FISH s rutinně používaným panelem sond pro CLL byly vyšetřeny následující aberace: delece 13q14, trizomie chromozomu 12, delece genů TP53 a ATM, delece 6q21, duplikace 8q24 a přestavba genu IGH. U 5 pacientů (20 %) se nevyskytovala žádná chromozomální změna, u 10 pacientů (40 %) byla prokázána jedna chromozomální změna, u 7 pacientů (28 %) dvě chromozomální změny a u 3 pacientů (12 %) tři a více chromozomálních změn. Nejčastěji byla detekována delece 13q14 a to v 56 % případů (14 pacientů). Druhou nejčastější aberací byla delece genu TP53, která byla pozorována ve 20 % případů (5 pacientů). V 16 % případů (4 pacienti) byla detekována delece genu ATM. Trizomie chromozomu 12 a delece 6q21 byly obě shodně pozorovány v 8 % případů (celkem 4 pacienti). Duplikace 8q24 byla stejně jako přestavba genu IGH prokázána ve 4 % případů (celkem 2 pacienti).

Delece 13q14 je nejčastěji detekovaná chromozomální změna a vyskytuje se ve více, než 50 % případů CLL (Puiggros *et al.*, 2014). Ve většině případů se jedná o monoalelickou delecí, ale u 30 % pacientů se vyskytuje jako delece bialelická (Chena *et al.*, 2008). Méně často dochází k současnému výskytu jak monoalelické, tak bialelické delece. Tato data odpovídají pouze částečně, jelikož v mém souboru pacientů byla delece 13q14 detekována u 56 % pacientů, z toho u 71 % pacientů se jednalo o monoalelickou delecí a ve 29 % případů se současně vyskytovala monoalelická a bialelická delece. Žádný pacient neměl samostatnou bialelickou delecí.



Podle Döhner *et al.* (2000) je trizomie 12 druhá nejčastější chromozomální aberace a vyskytuje se u 16 % pacientů s CLL. Avšak v mém souboru pacientů se trizomie 12 vyskytovala až jako čtvrtá nejčastější změna, a to u pouze 8 % nemocných. V obou případech se vyskytovala ještě spolu s další chromozomální změnou.

Delece *ATM* je v literatuře označována jako třetí nejčastější chromozomální aberace (Döhner *et al.* 2000). Jiang *et al.*, (2016) uvádí, že se vyskytuje u 10 – 20 % pacientů. Výsledky v mé práci tomuto tvrzení odpovídají, jelikož gen *ATM* byl deletován v 16 % případů. Delece genu *ATM* je považována za negativní prognostický faktor s mediánem přežití 79 měsíců (Kozák, 2008).

Delece *TP53* se podle Puiggros *et al.*, (2014) vyskytuje u 3 – 8 % pacientů. Tato změna je spojována s velmi špatnou prognózou a krátkým mediánem přežití – pouze 32 měsíců (Kozák, 2008). V mém souboru pacientů se delece *TP53* vyskytovala jako druhá nejčastější změna a byla pozorována ve 20 % případů (4 pacienti), z toho u 2 nemocných se vyskytovala jako samostatná změna a u 2 nemocných spolu s další změnou.

Delece 6q21 se vyskytuje u 3 – 6 % pacientů (Cuneo *et al.*, 2004). Má data se tomuto tvrzení blíží, jelikož delece 6q21 byla detekována u 8 % pacientů.

Duplikace *MYC* byla prokázána u 4 % nemocných (1 pacient). U tohoto pacienta se vyskytovala spolu s dalšími třemi chromozomálními změnami (delece 6q21, delece 13q14 a delece *TP53*). Podle Fonseka *et Tirado*, (2015) se duplikace *MYC* objevuje přibližně u 5 % pacientů.

Přestavba genu *IGH* není velmi častá a dochází k ní přibližně u 5 % pacientů (de Braekeleer *et al.*, 2016). Často ale dochází k parciální delecí 5'konce (variabilní segment *IGH*), což je považováno za fyziologickou delecí, ke které dochází při přeskupování V-D-J segmentů (Berkova *et al.*, 2008). Tomuto tvrzení odpovídají i má získaná data, kdy přestavba genu *IGH* byla detekována ve 4 % případů – v tomto případě došlo k translokaci t(14;18). Ve 20 % případů byla prokázána delece variabilní oblasti (5' konec) a u 8 % pacientů byla zjištěna pouze jedna kopie genu *IGH*.

Klasické cytogenetické vyšetření karyotypu bylo provedeno u 24 pacientů (u jednoho nebylo možné klasickou cytogenetiku provést z důvodu nedostatku biologického materiálu). U 22 pacientů bylo vyšetření úspěšné a byl určen karyotyp, zatímco u 2 pacientů nebyly získány kultivací žádné buňky ve stádiu metafáze. U 14 pacientů byl detekován normální karyotyp, u 8 pacientů (32 %) byly nalezeny chromozomální změny. Metodou interfázní FISH s CLL panelem sond mapujícím 8 specifických oblastí genomu byly aberace stanoveny u 19 pacientů (76 %). Tento náález odpovídá skutečnosti, že interfázní FISH zacílená na specifická místa

genomu je mnohonásobně citlivější detekční metoda. Zároveň je ale omezena pouze na cílové oblasti sond a ostatní oblasti genomu nemapuje. Důležitost kombinace obou metod se ukazuje např. u pacientky č. 8, kdy delece genu TP53 prokázaná metodou interfázní FISH byla dále vysvětlena změnou v karyotypu zahrnující přítomnost dic(17;22)(p?11;p?11) a dic(14;17)(p?11;p?11) (v tabulce neuvedeno, výsledek z předchozích odběrů) U 3 pacientů bylo dále provedeno upřesnění chromozomových změn pomocí metody mFISH a byly nalezeny další aberace nezachycené CLL panelem sond.

U jednoho pacienta byla pozorována v karyotypu duplikace krátkých ramen chromozomu 2, která se následně translokovala na chromozom 18, což bylo potvrzeno hybridizací s celochromozomovými sondami. Další chromozomální změny u něj nebyly pozorovány. Podle Jarošové *et al.*, (2010) tato změna souvisí s progresí onemocnění, většinou se ale vyskytuje s další chromozomální aberací.

V současné době je za významný negativní prognostický faktor považován i nález komplexního karyotypu (Puiggros *at al.*, 2017), který byl v našem souboru prokázán u 4 pacientů (16 %) (z toho u jednoho pacienta již v předchozím vyšetření) a který bychom nemohli určit u žádného z nich pouze s použitím interfázní FISH s CLL panelem sond. Přítom je nález komplexního karyotypu důležitým indikátorem nutnosti nasazení moderních kombinovaných režimů léčby.

Je velmi důležité kombinovat jednotlivá vyšetření, jelikož metoda FISH je omezena na cílové oblasti sond, nemapuje celý genom, a proto není schopna odhalit všechny chromozomální aberace. Pro komplexnost vyšetření a zpřesnění výsledků je vhodné kombinovat metodu FISH s klasickou cytogenetikou, mFISH a arrayCGH, která má vyšší rozlišení. Pokud by se v našem souboru pacientů používala jen metoda FISH s CLL panelem sond, unikly by naší pozornosti jiné chromozomální změny (nezahrnuté v CLL panelu) u 5 pacientů (20 %).

Výsledky klasické a molekulární cytogenetiky samy o sobě nestačí pro stanovení prognózy a určení léčební strategie, ačkoli k tomu významně přispívají. Pro získání celkového obrazu o stavu nemoci je nezbytné je posuzovat v souvislosti s klinickými parametry a dalšími laboratorními ukazateli, jako jsou např. mutační stav *IgVH*, *TP53* a dalších genů, výsledky imunofenotypizace a další.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo sestavit literární přehled nejčastějších chromozomálních změn u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) za použití panelu sond pro CLL jednotlivé změny detekovat.

U všech 25 pacientů s CLL jsem úspěšně provedla FISH s CLL panelem sond. Nejčastěji detekovanou chromozomální změnou u souboru 25 pacientů byla delece 13q14 (monoalelická i bialelická), dále pak delece genu TP53, delece genu ATM, delece 6q21, trizomie chromozomu 12, duplikace 8q24, přestavba genu IGH a duplikace 2p.

Tyto nalezené chromozomální změny jsem dále doplnila a porovnála s dalšími cytogenetickými a molekulárně cytogenetickými vyšetřeními, které byly provedeny v laboratoři LCG a LMB HOK. Kombinace jednotlivých cytogenetických a molekulárně cytogenetických vyšetření je důležitá pro získání komplexnějšího přehledu chromozomálních změn, kdy je nutné použít kromě metody FISH (s genovými, celochromozomovými a centromerickými sondami), také metody mFISH a arrayCGH, stejně jako výsledky klasické cytogenetiky a analýzy mutačního stavu *IgVH*. Z důvodu malého počtu vyšetřených pacientů se naše výsledky v četnosti nálezu jednotlivých chromozomálních aberací liší oproti porovnávané literatuře.

Stanovení prognostických faktorů, mezi něž u CLL patří chromozomové aberace, je jednou z důležitých součástí prognostické stratifikace pacientů a má vliv na stanovení léčebné strategie.

## 8 Literatura

Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. (2008): Hematologie – Přehled maligních hematologických nemocí: 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Grada, Praha.

Anděl M., Gregor P., Horák J., Kment M., Widimský P. (2001): Vnitřní lékařství, díl IIIb, Hematologie. Galén, Praha.

Baliakas P., Iskas M., Gardiner A., Davis Z., Plevova K., Nguyen-Khac F., Malcikova J., Anagnostopoulos A., Glide S., Mould S., Stepanovska K., Brejcha M., Belessi Ch., Davi F., Pospisilova S., Athanasiadou A., Stamatopoulos K., Oscier D. (2014): Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: A systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American Journal of Hematology* 89: 249-255.

Berkova A., Pavlistova L., Babicka L., Houskova L., Tajtalova 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):400-408.

Binet J. L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguët H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M. T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F. (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48: 98-206.

Cuneo A., Rigolin G. M., Bigoni R., De Angeli C., Veronese A., Cavazzini F., Bardi A., Roberti M. G., 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.

Dal Bo M., Rossi F. M., Rossi D., Deambrogi C., Bertoni F., Del Giudice I., Palumbo G., Nanni M., Rinaldi A., Kwee I., Tissino E., Corradini G., Gozzetti A., Cencini E., Ladetto M., Coletta A. M., Luciano F., Bulian P., Pozzato G., Laurenti L., Forconi F., Di Raimondo F., Marasca R., Del Poeta G., Gaidano G., Foa R., Guarini A., Gattei V. (2011): 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 50: 633-643.

Damle R. N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S. L., Buchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman S. M., Schulman P., Vinciguerra V. P., Rai K. R., Ferrarini M., Chiorazzi N. (1999): Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*: 94: 1840-1847.

- De Braekeleer M., Tous C., Guéganic N., Le Bris M-J., Basinko A., Morel F., Douet-Guilbert N. (2016): Immunoglobulin gene translocations in chronic lymphocytic leukemia: A report of 35 patients and review of the literature. *Molecular and Clinical Oncology* 4: 682-694.
- Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 343(26): 1910-1916.
- Dylevský I. (2009): *Funkční anatomie*. Grada, Praha.
- Eichhorst B., Dreyling M., Robak T., Montserrat E., Hallek M. (2011): Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 22: 50-54.
- Fonseka L. N., Tirado C. A. (2015): *C-MYC* Involvement in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): A Molecular and Cytogenetic Update. *Journal of the Association of Genetic Technologists* 41(4).
- Friedmann B., Vaňásek J. (1994): *Hematologie v praxi*. Galén, Praha.
- Gray J. W., Pinkel D., Brown J. M. (1994): Fluorescence *in situ* hybridization in cancer and radiation biology. *Radiation Research* 137: 275-289.
- Han T., Ozer H., Sadamori N., Emrich L., Gomez G. A., Henderson E. S., Bloom M. L., Sandberg A. A. (1984): Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 310: 288-292.
- Huh Y. O., I-Chun Lin K., Vega F., Schlette E., Yin C. C., Keating M. J., Luthra R., Medeiros L. J., Abruzzo L. V. (2008): *MYC* translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis. *British Journal of Haematology* 142: 36-44.
- Chena Ch., Avalos J. S., Bezares R. F., Arrossagaray G., Turdó K., Bistmans A., Slavutsky I. (2008): Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *European Journal of Haematology* 81: 94-99.
- Chiorazzi N., Rai K. R., Ferrarini M. (2005): Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 352: 804-815.
- Jarošová M., Urbánková H., Plachý R., Papajík T., Holzerová M., Balcárková J., Pikalová J., Divoký V., Indrák K. (2010): Gain of chromosome 2p in chronic lymphocytic leukemia: significant heterogeneity and a new recurrent dicentric rearrangement. *Leukemia & Lymphoma* 51(2): 304-313.

Jarošová M., Hrubá M., Oltová A., Plevová K., Krůzová L., Kriegová E., Fillerová R., Koritáková E., Doubek M., Lysák D., Procházka V., Mráz M., Indrák K., Papajík T. (2017): Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients. *American Journal of Hematology* 92(10): E604-E607.

Jiang Y., Chen H. C., Su X., Thompson P. A., Liu X., Do K. A., Wierda W., Keating M. U., Plunkett W. (2016): ATM function and its relationship with ATM gene mutations in chronic lymphocytic leukemia with the recurrent deletion (11q22.3-23.2). *Blood Cancer Journal* 6: 1-8.

Kipps T. J., Stevenson F. K., Wu C. J., Croce C. M., Packham G., Wierda W. G., O'Brien S., Gribben J., Rai K. (2017): Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers* 3: 1-21.

Kozák T. (2008): Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie* 2(3): 156-162.

Lexová S., Bourková L., Buliková A., Jarošová M., Krahulcová E. (2000): Hematologie pro zdravotní laboranty, 1. díl. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno.

Lukáš K., Žák A. a kol. (2015): Chorobné znaky a příznaky: Diferenciální diagnostika. Grada, Praha.

Navrkalova V., Sebejova L., Zemanova J., Kminkova J., Kubesova B., Malcikova J., Mráz M., Smardova J., Pavlova S., Doubek M., Brychtova Y., Potesil D., Nemethova V., Mayer J., Pospisilova S., Trbusek M. (2013): ATM mutations uniformly lead to ATM dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: application of functional test using doxorubicin. *Haematologica* 98(7).

O'Brien S., Furman R. R., Coutre S. E., Sharman J. P., Burger J. A., Blum K. A., Grant B., Richards D. A., Coleman M., Wierda W. G., Jones J. A., Zhao W., Heerema N. A., Johnson A. J., Izumi R., Hamdy A., Chang B. Y., Graef T., Clow F., Buggy J., James D. F., Byrd J. C. (2014): Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *The Lancet Oncology* 15: 48-58.

Ouillette P., Collins R., Shakhan S., Li J., Li Ch., Shedden K., Malek S. N. (2011): The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research* 17(21): 6778-6790.

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

- Pritchard D. J., Korf B. R. (2007): *Základy lékařské genetiky*. Galén, Praha.
- Puiggros A., Blanco G., Espinet B. (2014): Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: Where we are and where we go. *BioMed Research International* 2014.
- Puiggros A., Collado R., Calasanz M. J., Ortega M., Ruiz-Xivillé N., Rivais-Delgado A., Luno E., González T., Navarro B., García-Malo M., Valiente A., Hernández J. A., Ardanaz M. T., Pinan M. A., Blanco M. L., Hernández-Sánchez M., Batlle-López A., Salgado R., Salido M., Ferrer A., Abrisqueta P., Gimeno E., Abella E., Ferrá Ch., Terol M. J., Ortuno F., Costa D., Moreno C., Carbonell F., Bosch F., Delgado J., Espinet B. (2017): Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget* 8(33): 54297-54303.
- 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 Ch., Barin C., Eelache V., Fert-Ferrer S., Laibe S., Mozziconacci M.-J., Quilichini B., Poirel H. A., Wlodarska I., Hagemeyer A., Moreau Y., Vandenberghe P., Michaux L. (2012): Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with *MYC* translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Annals of Hematology* 91: 863-873.
- Rai K. R., Jain P. (2016): Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then end now. *American Journal of Hematology* 91(3): 330-340.
- Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E. P., Chanana A. D., Levy R. N., Pasternack B. S. (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219-234.
- Redaelli A., Laskin B. L., Stephens J. M., Botteman M. F., Pashos C. L. (2004): The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *European Journal of Cancer Care* 13: 279-287.
- Šafránková A., Nejedlá M. (2006): *Interní ošetřovatelství II*. Grada, Praha.
- Taborelli M., Tibiletti M. G., Martin V., Pozzi B., Bertoni F., Capella C. (2005): Chromosome band 6q deletion pattern in malignant lymphomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 165: 106-113.
- Te Raa G. D., Kater A. P. (2016): TP53 dysfunction in CLL: Implications for prognosis and treatment. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 29: 90-99.
- Trask B., Pinkel D. (1990): Fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Methods in Cell Biology* 33: 383-403
- Speicher M. R., Ballard S. G., Ward D. C. (1996): Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12: 368-375.

Trbusek M., Malcikova J., Smardova J., Kuhrova V., Mentzlova D, Francova H., Bukovska S., Svitakova M., Kuglik P., Linkova V., Doubek M., Brychtova Y., Zagal J., Kujickova J., Pospisilova S., Dvorakova D., Vorlicek J., Mayer J. (2006): Inactivation of p53 and deletion of *ATM* in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia* 20: 1159-1161.

Vasilj A., Kojic-Katovic S., Mariéevic I., Zokvic E., Bobus Keléec I., Tornas D., Curic-Juric S. (2009): Hodgkin's Lymphoma Variant of Richter's Syndrome. *Collegium Antropologicum* 34(1): 295-299.

Werner M., Wilkens L., Aubele M., Nolte M., Zitzelsberger H., Komminoth P. (1997): Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods and applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Histochemistry and Cell Biology* 108: 381-390.

Zenz T., Vollmer D., Trbusek M., Smardova J., Benner A., Soussi T., Heuberger M., Hoth P., Fuge M., Denzel T., Häbe S., Malcikova J., Kuglik P., Truong S., Patten N., Wu L., Oscier D., Ibbotson R., Gardiner A., Tracy I., Lin K., Pettit A., Pospisilova S., Mayer J., Hallek M., Döhner H., Stilgenbauer S. (2010): TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 24: 2072-2079.

Benner D. B., Ness B. (2014): Chromosome structure. Salem Press Encyclopedia of Health 6p. [online] [navštíveno 10.1.2018] Dostupné z <http://ezdroje.upol.cz/>

Hallek M. (2017): Revised iwCLL guidelines for the approach to a CLL patient – presentation at iwCLL 2017. [online] [navštíveno 19.2.2018] Dostupné z <http://www.lymphomahub.com>