

Univerzita Palackého v Olomouci  
Lékařská fakulta

---

# CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE – STANOVENÍ INDIVIDUÁLNÍ PROGNÓZY NEMOCNÉHO

---

Disertační práce

**Autor: MUDr. Renata Urbanová**

Pracoviště: Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

Olomouc 2015

**Jméno a příjmení autora:** MUDr. Renata Urbanová

**Název disertační práce:** Chronická lymfocytární leukémie – stanovení individuální prognózy nemocného

**Pracoviště:** Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

**Školitel:** prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

**Rok obhajoby disertační práce:** 2015

**Abstrakt:** Předložená práce přináší souhrn současných poznatků o možnostech stanovení prognózy nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. Vlastní výzkumná část práce retrospektivně analyzuje stanovené prognostické faktory ve vztahu k celkovému přežití u souboru 417 nemocných diagnostikovaných v letech 2000-2011 na HOK LF UP a FN Olomouc. V multivariantní analýze jsme prokázali nepříznivý prognostický význam věku > 65 let, nemutovaného stavu *IGHV*, delece 17p a počtu lymfocytů > 50×10<sup>9</sup>/l. Podrobně byly dále popsány podsoubory nemocných se subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69*. V současnosti, kdy se před námi otevírají nové léčebné možnosti a koncept individualizované léčby, nabývá a studium prognostických faktorů opět na významu.

**Klíčová slova:** chronická lymfocytární leukémie, prognostické faktory, mutační stav *IGHV*

Disertační práce byla zpracována v rámci řešení výzkumného záměru LF-2014-001 a VZ MŠMT ČR 6198959205.

Souhlasím s půjčováním disertační práce v rámci knihovních služeb.

**Autor's first name and surname:** Renata Urbanová, M.D.

**Title of the doctoral thesis::** Chronic lymphocytic leukemia – assessment of individual prognosis

**Department:** Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc,

**Supervisor:** Tomas Papajik, M.D., Ph.D., Professor

**The year of presentation:** 2015

**Abstrakt:** Our paper presents summary of recent knowledge about the possibilities of prognostic assessment in patients with chronic lymphocytic leukemia. The scientific part of the paper analyses retrospectively prognostic factors with regard to overall survival in a group of 417 patients diagnosed during 2000-2011 at the Department of Hemato-oncology of Medical Faculty of Palacky university and Faculty Hospital Olomouc. Multivariate analysis confirmed unfavorable impact of age > 65 years, unmutated IGHV status, deletion of 17p and the absolute lymphocyte count > 50×10<sup>9</sup>/l. We described in detail the subgroups of patients with subgenes *IGHV3-21* and *IGHV1-69*. At present, with new treatment possibilities and with the concept of individualized treatment, the study of prognostic factors increases its significance.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia, prognostic factors, *IGHV* mutation status

Supported by research projects LF-2014-001 and VZ MŠMT ČR 6198959205.

I agree the thesis paper to be lent within the library service.

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Tomáše Papajíka, CSc, uvedla jsem všechny použité literární zdroje a dodržovala jsem zásady vědecké etiky.

V Olomouci 10. února 2015

## Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Tomáši Papajíkovi, CSc., přednostovi Hemato-onkologické kliniky LF UP a FN Olomouc, za odborné vedení po celou dobu studia doktorského studijního programu, dále za cenné rady při zpracování doktorské práce.

Mé díky patří emeritnímu přednostovi Hemato-onkologické kliniky LF UP a FN Olomouc prof. MUDr. Karlu Indrákovi, DrSc., pod jehož vedením jsem mohla více než 15 let pracovat a prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc., za pomoc při analýzách některých výsledků předkládané práce.

Zájem o obor ve mně probudil prof. MUDr. Ladislav Chrobák, CSc., (in memoriam) a taktéž mě podpořil v mém úmyslu věnovat se právě hematologii. Za to mu upřímně děkuji.

Současně chci poděkovat paní Ivě Marešové za pomoc při zpracování databáze pacientů, Mgr. Janě Vrbkové, PhDr., za statistické zpracování dat a manželovi Josefovi za pomoc při grafické úpravě práce.

## Obsah

1.	Úvod .....	9
1.1.	Charakteristika a cíle práce .....	10
1.1.1.	Charakteristika práce .....	10
1.1.2.	Cíle práce .....	10
2.	Diagnostická kritéria, imunofenotyp nádorových buněk .....	11
2.1.	Diagnostická kritéria .....	11
2.2.	Imunofenotyp nádorových buněk .....	12
3.	Epidemiologie, etiologie, historie .....	14
3.1.	Epidemiologie .....	14
3.2.	Etiologie .....	16
3.3.	Historie .....	16
4.	Patogeneze a biologie .....	18
4.1.	BCR receptor .....	19
4.2.	Mutace <i>IGHV</i> genů .....	20
4.3.	ZAP-70 a CD38 .....	25
4.4.	Porucha apoptózy, gen <i>p53</i> .....	25
4.5.	Mikroprostředí, angiogeneze .....	26
4.6.	MicroRNA .....	28
4.7.	Primární místo patogeneze CLL .....	28
4.8.	Monoklonální B lymfocytóza .....	29
5.	Prognostické faktory .....	31
5.1.	Konvenční prognostické faktory .....	32
5.1.1.	Klinické stádium onemocnění .....	32
5.1.2.	Zdvojovací čas lymfocytů .....	33
5.1.3.	Typ infiltrace kostní dřeně .....	33
5.1.4.	Věk a pohlaví .....	34
5.1.5.	Počet lymfocytů v periferní krvi .....	34
5.1.6.	Morfologie lymfocytů .....	35
5.2.	Biologické prognostické markery .....	35
5.2.1.	Beta-2-mikroglobulin (B2M) .....	36
5.2.2.	Sérová tymidinkináza (sTk) .....	36

5.2.3.	Mutační stav <i>IGHV</i> .....	37
5.2.4.	ZAP-70 a CD38.....	38
5.2.5.	Subgeny <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> .....	39
5.2.6.	Stereotypní BCR a subset #2.....	40
5.2.7.	Cytogenetika a molekulární cytogenetika.....	43
5.2.7.1.	13q14.....	45
5.2.7.2.	Trisomie 12.....	45
5.2.7.3.	Delece 11q22-q23.....	46
5.2.7.4.	Delece 17p.....	46
5.2.8.	Molekulární biologie.....	47
5.2.8.1.	Mutace v genu <i>p53</i> .....	47
5.2.8.2.	Mutace v genu <i>ATM</i> .....	48
5.2.8.3.	Mutace v genu <i>NOTCH1</i> .....	49
5.2.8.4.	Mutace v genu <i>SF3B1</i> .....	50
5.2.8.5.	Mutace v genu <i>BIRC3</i> .....	50
5.3.	Molekulární genetika a vývoj onemocnění.....	51
5.4.	Klonální vývoj onemocnění.....	52
5.5.	Richterův syndrom.....	53
5.6.	Prognostické indexy.....	54
5.7.	Stupeň dosažení léčebné odpovědi.....	56
5.7.1.	Minimální reziduální choroba (MRD).....	56
5.7.2.	Refrakterita k léčbě a refrakterita k léčbě fludarabinem.....	57
5.8.	Prognostický přínos CT vyšetření.....	58
6.	Léčba a léčebná odpověď.....	59
7.	Stanovení individuální prognózy pacienta, vlastní výsledky.....	65
7.1.	Vyšetřované prognostické faktory.....	65
7.2.	Metody stanovení prognostických faktorů.....	65
7.2.1.	Metody cytogenetické a molekulárně cytogenetické.....	65
7.2.2.	Metoda stanovení mutačního stavu <i>IGHV</i> genů.....	66
7.2.3.	Metoda stanovení ZAP-70 a CD38.....	66
7.2.4.	Metoda stanovení B2M a sTk.....	67
7.2.5.	Metody statistické.....	67
7.3.	Výsledky.....	68
7.3.1.	Charakteristika souboru pacientů.....	68

7.3.1.1.	Zastoupení VH rodin souboru .....	71
7.3.1.2.	Léčba nemocných .....	72
7.3.2.	Charakteristika podsouboru pacientů se subgeny <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> .....	72
7.3.3.	Analýza významu prognostických faktorů ve vztahu k OS .....	74
7.3.3.1.	Univariantní statistická analýza.....	74
7.3.3.2.	Multivariantní statistická analýza .....	82
7.3.4.	Prognostický význam subgenů <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> ve vztahu k OS.....	83
7.3.5.	Analýza významu ostatních prognostických faktorů u subgenů <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> ve vztahu k OS .....	87
7.3.6.	Analýza TFS u subgenů <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> a u stereotypního BCR subset #2 .....	88
7.3.7.	Srovnání výskytu rekurentních cytogenetických změn u subgenů <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> a u stereotypního BCR subset #2 .....	89
7.3.8.	Posouzení závislosti výpovědní hodnoty vybraných prognostických faktorů – Fisherův přesný test.....	94
7.3.9.	Srovnání rizikových podskupin nemocných .....	96
8.	Diskuze .....	100
8.1.	Charakteristika souboru nemocných, analyzované prognostické faktory .....	100
8.2.	Charakteristika nemocných se subgeny <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> .....	102
8.2.1.	Subgen <i>IGHV3-21</i> .....	102
8.2.2.	Subgen <i>IGHV1-69</i> .....	104
8.3.	Univariantní a multivariantní analýza studovaných prognostických faktorů ve vztahu k OS.....	106
8.4.	Subgeny <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> – univariantní a multivariantní analýza OS a TFS .....	111
8.5.	Heterogenita podsouboru se subgenem <i>IGHV3-21</i> a homogenita podsouboru se subgenem <i>IGHV1-69</i> .....	112
8.6.	Rekurentní cytogenetické aberace u subgenů <i>IGHV3-21</i> a <i>IGHV1-69</i> a u stereotypního BCR (subset #2) .....	113
8.7.	Diskuze ke srovnání rizikových podskupin nemocných.....	114
9.	Závěry práce .....	117
10.	Souhrn .....	119
11.	Abecední seznam zkratk .....	121
12.	Citace literatury .....	123



## 1. Úvod

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je biologicky a klinicky extrémně heterogenní, konzervativní léčbou nevléčitelné nádorové onemocnění. U prognosticky nepříznivých skupin nemocných se přežití i přes moderní terapii pohybuje mezi 3–5 lety. Řada pacientů naopak přežívá bez léčby 10 a více let. Prognostické faktory stanovené při diagnóze onemocnění mají pomoci u konkrétního pacienta odhadnout pravděpodobné chování nemoci, její budoucí aktivitu, interval do zahájení léčby a v neposlední řadě také možnou délku přežití. V posledních 15 letech se s narůstajícími klinickými zkušenostmi pohled na význam jednotlivých prognostických faktorů vyvíjí a mění.

Problematika studia prognostických faktorů u pacientů s CLL intenzivně zaměstnává týmy klinických i laboratorních pracovníků na celém světě. Od stanovení některých faktorů se upouští, neboť neprokázaly v klinické praxi svůj přínos, na druhé straně nové metody výzkumu nádorových buněk jako je sekvenování nové generace („next generation sequencing“) umožňují dnes studovat mnohé další, potenciální prognostické faktory, které mohou mít v budoucnu vztah k výběru cílené léčby, a tím ke zlepšení prognózy řady biologicky agresivních podtypů CLL.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem jsem si zvolila jako základ své dizertační práce právě téma současného významu vybraných prognostických faktorů.

## 1.1. Charakteristika a cíle práce

### 1.1.1. Charakteristika práce

Předkládaná práce je retrospektivní analýzou souboru nemocných s CLL nově diagnostikovaných v letech 2000–2011, následně sledovaných a léčených v podmínkách standardní klinické praxe na Hemato-onkologické klinice Lékařské fakulty UP a Fakultní nemocnice Olomouc. Práce se zaměřuje především na posouzení významu vybraných prognostických faktorů na celkové přežití nemocných.

### 1.1.2. Cíle práce

1. Podat ucelený, aktuální přehled poznatků o prognostických faktorech u CLL.

2. Analyzovat vlastní výsledky stanovení konvenčních, ale zejména nových prognostických faktorů (sérových markerů, výsledků cytogenetického, molekulárně genetického a molekulárně biologického vyšetření, stanovení mutačního stavu *IGHV*, vyšetření znaků ZAP-70 a CD38 pomocí průtokové cytometrie) primárně vzhledem k celkovému přežití nemocných.

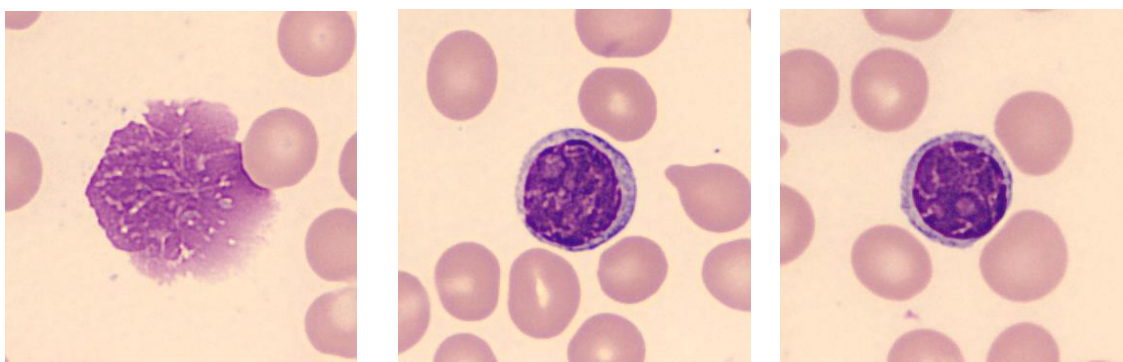
3. Popsat podsoubor nemocných se subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69* a posoudit jejich prognostický význam, u *IGHV3-21* se zaměřit na význam stanovení stereotypního B-buněčného receptoru (BCR), dříve Skandinávského receptoru, nyní označovaného jako subset #2.

4. Vybrat nejvhodnější prognostické faktory pro rutinní použití v naší současné klinické praxi.

## 2. Diagnostická kritéria, imunofenotyp nádorových buněk

### 2.1. Diagnostická kritéria

WHO v nejnovější verzi „Klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně“ z roku 2008 definuje CLL a lymfom z malých lymfocytů (SLL) jako nádorové onemocnění tvořené monomorfní populací malých kulatých až lehce nepravidelných B lymfocytů, které se vyskytují nejčastěji v PK, KD, slezině a lymfatických uzlinách. Termín SLL je používán pro nodální formu onemocnění bez výraznější leukemizace s tkáňovou morfologií a imunofenotypem shodným s CLL. Diagnóza SLL musí být ověřena histologickým vyšetřením lymfatické uzliny (1). Diagnóza CLL vyžaduje přítomnost minimálně  $5 \times 10^9/l$  lymfocytů v periferní krvi po dobu více než 3 měsíců. Klonalita cirkulujících B lymfocytů musí být potvrzena imunofenotypizací metodou průtokové cytometrie. V krevním nátěru, jak již bylo stručně uvedeno výše, jsou nacházeny malé, zralé lymfocyty s úzkým lemem cytoplazmy, kondenzovaným jádrem bez jadérek. Tyto buňky mohou být v některých případech doprovázeny příměsí větších, atypických lymfocytů s naštípnutým jádrem nebo prolymfocyty, které mohou tvořit až 55 % všech nádorových buněk (2). Nález prolymfocytů nad 55 % vede ke stanovení diagnózy prolymfocytární leukémie (PLL). V nátěrech nacházíme také typické Gumprechtovy jaderné stíny.



**Obrázek 1: Nátěr periferní krve pacienta s CLL: Gumprechtův stín a malé zralé lymfocyty s kondenzovaným jádrem bez jadérek (foto Lapčíková; archiv HOK LF UP a FN Olomouc)**

Pokud u jinak zdravého člověka bez přítomné lymfadenomegalie a organomegalie, cytopenie nebo B-symptomů, nalezneme klonální B lymfocyty v počtu menším než  $5 \times 10^9/l$ , pak je tento stav definován jako monoklonální B

lymfocytóza (MBL) (3). U 1–2% případů ročně může MBL progredovat do CLL (4).

## 2.2. Imunofenotyp nádorových buněk

Na buňkách CLL dochází charakteristicky ke koexpresi T buněčného antigenu CD5 a povrchových antigenů B lymfocytů: CD19, CD20 a CD23. Povrchový imunoglobulin, CD20 a CD79b antigeny jsou exprimovány slaběji ve srovnání s expresí na fyziologických B lymfocytech. Každý klon leukemických buněk má expresi buď  $\kappa$  nebo  $\lambda$  lehkých řetězců imunoglobulinu. Buňky CLL v polovině případů neexprimují CD5 antigen, typická je naopak vysoká exprese CD20 a povrchového imunoglobulinu. Buňky lymfomu z plášťových buněk také exprimují CD5 a povrchové antigeny B lymfocytů, ale není zde patrná exprese antigenu CD23 (5, 6).

Matutes s kolektivem spoluautorů navrhli v roce 1994 diagnostický skórovací systém založený na expresi a intenzitě barvení pěti imunofenotypových znaků nádorových lymfocytů: slg, CD5, CD23, FMC7 a CD22. Skóre hodnotí expresi CD5 (1 bod), CD23 (1 bod), nízkou expresi slg (1 bod), chybění znaku FMC7 (1 bod) a negativní nebo slabou expresi znaku CD22 (1 bod). Většina CLL má vysoké skóre (4–5 bodů), ostatní B-lymfoproliferativní nádorová onemocnění mají skóre nízké (0–1 bodů). Přidání dalšího znaku CD79b k panelu pěti standardních markerů (CD5, CD22, CD23, FMC7, slg) zvyšuje přesnost diagnostiky CLL (Tabulka 1) (5). Většina případů CLL je pro znak CD79b negativní.

Tabulka 1: Skóre stanovení CLL průtokovou flowcytometrií

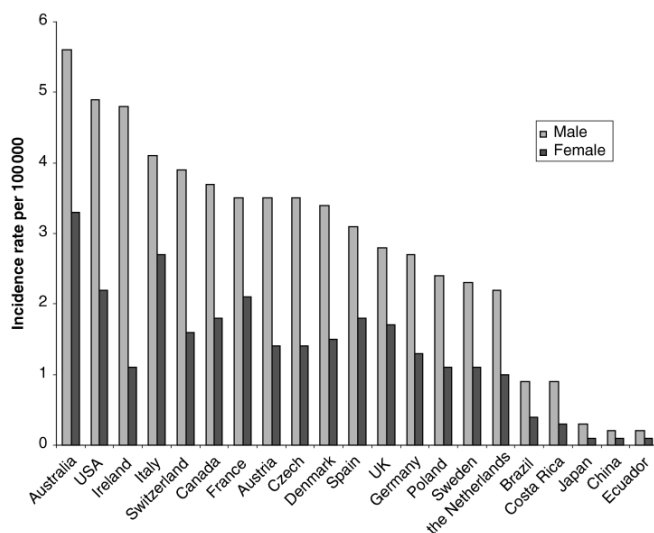
Ukazatel	Body	
	1	0
<b>CD5</b>	Pozitivní	Negativní
<b>CD23</b>	Pozitivní	Negativní
<b>slg</b>	Slabě	Silně
<b>CD79b</b>	Slabě	Silně
<b>FMC7</b>	Negativní	Pozitivní

Ostatní vyšetření prováděná u CLL (např. cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření, stanovení mutačního stavu *IGHV*) již k diagnostice onemocnění nejsou zapotřebí, ale řada z nich slouží ke stanovení prognózy onemocnění (1).

### 3. Epidemiologie, etiologie, historie

#### 3.1. Epidemiologie

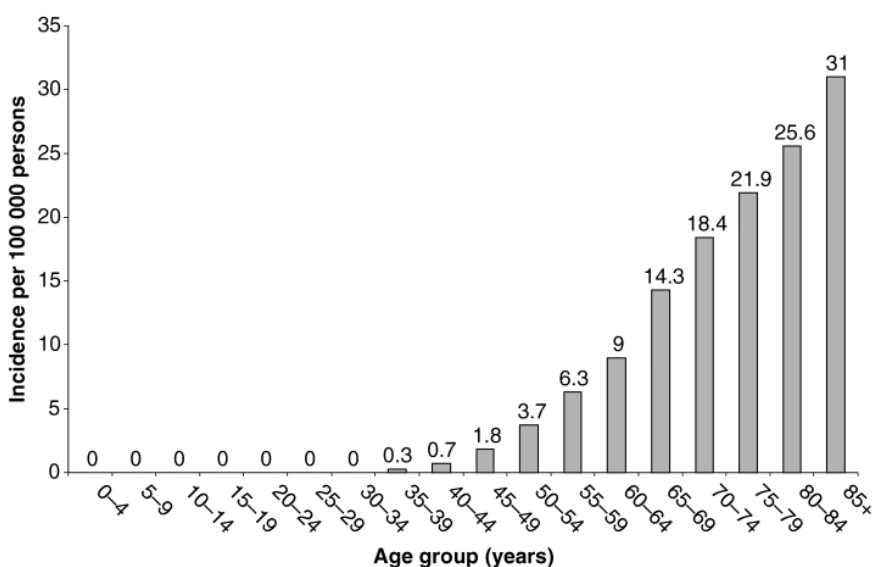
CLL je typicky onemocnění starších lidí, jeho incidence stoupá s věkem. V USA je uváděná incidence 5,04 případů na 100 000 obyvatel a rok. Jedná o nejčastější leukémii diagnostikovanou na západní polokouli, kde tvoří 30 % všech diagnostikovaných leukémií. Naopak v zemích jako je Čína a Japonsko CLL představuje jen 3–5 % ze všech leukémií, její incidence je v těchto zemích výrazně nižší (Graf 1).



**Graf 1: Hlášená incidence onemocnění ve světě** (Redaelli a kol., 2004) (7)

Přestože CLL je popisována jako nejčastější leukémie v USA a západní Evropě, skutečný výskyt CLL v mnoha zemích není znám a odhaduje se z nádorových registrů, které jsou mnohdy založeny na výsledcích patologických vyšetření nebo výsledcích léčby. Tyto registry tudíž výskyt CLL výrazně podhodnocují, protože CLL je dnes diagnostikována metodou průtokové flowcytometrie buněk periferní krve a navíc většina nemocných nevyžaduje léčbu v době diagnózy. Podle autorů Zent a kol. je hlášenost do takových registrů, zejména v USA, kolem 35 % skutečně diagnostikovaných nemocných (8).

Reálná data o incidenci CLL v ČR chybí. Epidemiologickou studii na území Jihomoravského kraje provedenou metodou sběru dat z dotazníků provedl Doubek a kolektiv. V jejich práci byla v roce 2006 zjištěna incidence CLL 5,8 případů na 100 000 obyvatel a v roce 2007 byla incidence 6,2 případů na 100 000 obyvatel (9). S věkem incidence onemocnění stoupá (Graf 2). Průměrný věk pacientů s nově diagnostikovanou CLL je různými autory uváděn různě, rozpětí může být značné. Rozman uvádí průměrný věk 65 let a 10–15 % nově diagnostikovaných pacientů pod 50 let věku (10). Medián věku v době diagnózy uvádí Eichhorstová 72 let, 10 % nemocných je pak ve věku pod 55 let (11).



**Graf 2: Nárůst incidence CLL ve vyšším věku** (Redaelli a kol., 2004) (7)

Onemocnění postihuje častěji muže než ženy, poměr incidence u mužů a žen kolísá podle autora a populace, na které byla zjišťována. Je uváděno, že muži jsou postiženi zhruba dvakrát častěji než ženy (7).

Příbuzní nemocných s CLL mají vyšší riziko lymfoproliferativního onemocnění. Tuto genetickou vazbu lze prokázat asi u 5–10 % pacientů s CLL. Do dnešního dne nebyly objasněny dědičné mutace specifických genů, ale byl popsán rodinný výskyt epigenetických abnormalit. Studium molekulárně genetických změn u pacientů s familiárními formami CLL je však nesmírně cenné a slouží k detailnějšímu poznání predisponujících mutací ve vývoji CLL (12).

### 3.2. Etiologie

Etiologie CLL není v současné době známa. Na velkých epidemiologických studiích byl hodnocen vliv zevních faktorů, např. virů, vliv ionizujícího záření, kancerogenních chemikálií (pesticidů, rozpouštědel) či mutagenních léků. Tyto studie neprokázaly vliv zevních faktorů na vývoj onemocnění (13, 14). Pouze u pracovníků v zemědělství je uváděna lehce vyšší incidence (15).

### 3.3. Historie

Objevy, které předcházely popisu CLL, se datují k roku 1845. V tomto roce charakterizoval bělokrevnost (leukémii) Rudolf Virchow a současně s ním popsal případy pacientů, kteří trpěli leukémií, John Hughes Bennett. Historicky známé skutečnosti jsou v tomto případě současně ukázkou sporu o prvenství objevu leukémie. Nabarvit leukocyty naučil svět Paul Erlich. V roce 1909 shrnul znalosti o onemocnění William Osler v *The Principles and Practice of Medicine* (16). Ve své knize popsal chronickou lymfocytární leukémii jako onemocnění, kdy pacienti mohou žít tři, pět, deset, třináct let. Nemocní mívají leukocytózu, zvětšené uzliny, abdominální tumor ze zvětšených uzlin, zvětšenou slezinu, ale jen raritně extrémně velkou. Jedná se o starší pacienty. Časté jsou také anémie, horečky, krvácení, tonsilitida a stomatitida, taktéž bývají změny na kůži. Na to, že se psal rok 1909, jde o velmi přesnou klinickou charakteristiku onemocnění. V roce 1924 George Minot a Raphael Isaacs publikovali klinickou práci, která shrnuje klinický obraz onemocnění a terapii 80 pacientů s CLL (17). Galton v roce 1966 charakterizoval CLL jako heterogenní onemocnění a předložil zkušenosti s dlouhodobým sledováním 88 pacientů, kdy choroba v průběhu let může a nemusí být aktivní (lymfocytóza může, ale nemusí progredovat). Popsal chorobu jako neoplazii s akumulací normálních lymfocytů, u progredujícího počtu lymfocytů popisuje selhávání funkce kostní dřeně. Všiml si velikosti uzlin, sleziny a systémových příznaků onemocnění ve vzájemném vztahu (18).

V roce 1972 byl ozřejmen původ buněk CLL. Jednalo se o B lymfocyty, na povrchu buněk byly nalezeny povrchové imunoglobuliny (19). Naprosto stěžejní



pro klinickou práci bylo rozdělení onemocnění do stádií Raiem v roce 1975 a Binetem v roce 1981 (20, 21).

Gahrton v roce 1980 objevil první nenáhodnou cytogenetickou abnormalitu u buněk CLL, a to trisomii chromosomu 12 (22). V roce 1982 byl detailně popsán imunofenotyp CLL (23). Pro klinickou praxi byl důležitý rok 1996, kdy byla uceleně publikována mezinárodní konsenzuální diagnostická kritéria choroby a kritéria léčebné odpovědi (24). Prognostická role změn genu *p53* u CLL byla objevena v roce 1997 (25). Téhož roku byla popsána delece 11q jako významný negativní prognostický faktor pro přežití pacientů s CLL, kteří jsou většinou charakterizováni výrazným zvětšením uzlin (26). O dva roky později byl publikován biologický a prognostický význam mutací genu *IGHV* (27).

První zmínka o léčbě lymfoidních malignit pochází z počátku 20. století a týkala se efektu radioterapie. Chlorambucil byl objeven v 50. letech 20. století a dlouho byl nejúčinnějším lékem pro pacienty s CLL (28). Michael Keating v roce 1989 poprvé referuje o použití fludarabinu v léčbě CLL. Efekt terapie byl závislý od stádia onemocnění a léčebné odpovědi byly pozorovány u více než 60 % pacientů ve stádiu 0-II dle Rai a kolem 50 % ve stádiu Rai IV (29). Alemtuzumab, anti-CD52 protilátka, byl objeven v 80. letech 20. století. Práce z roku 1988 popisuje indukci remise u ne Hodgkinského lymfomu (NHL) s použitím této protilátky (30). Výsledky většího souboru HLA identických příbuzenských transplantací pro CLL byly publikovány v roce 1996, v roce 2001 byly publikovány první ucelené zkušenosti s využitím protilátky anti-CD20 (rituximabu) v léčbě CLL (31-33).

#### 4. Patogeneze a biologie

Popsat detailně aktuální znalosti o patogeneze CLL je pro lékaře hematologa záležitost poměrně obtížná. Přesto se jí pokusím podrobněji věnovat, protože prognóza jednoho každého pacienta sahá hluboko k patogeneze onemocnění. Vývoj B lymfocytu u zdravého jedince stejně jako vývoj nádorového B lymfocytu je záležitost nesmírně zajímavá, ale také velmi složitá a v mnohém jistě ne zcela jasná.

Teorie Damesheka publikovaná v roce 1967, kde se o CLL mluví jako o klonálním onemocnění s akumulací poměrně malých zralých lymfocytů byla pochopitelně překonána (34). CLL byla dlouho považována za maligní lymfoproliferaci imunologicky inkompetentního nezralého B lymfocytu s nízkou proliferací a porušenou apoptózou, která vede k akumulaci leukemických lymfocytů v organismu (10).

Chiorazzi v roce 2005 popisuje CLL jako klinicky heterogenní onemocnění pocházející z B lymfocytů, kdy se nádorové buňky mohou lišit ve stupni diferenciace, aktivace, zrání, a klon jednoho pacienta pak představuje jeden konkrétní typ buněk (35). Dnes víme, že buňky CLL pochází z lymfocytů, které se s antigeny setkaly, mají antigenní zkušenost, nejedná se o naivní lymfocyty, jak se předpokládalo původně, ale může se jednat o skutečné paměťové buňky. Nádorové elementy se liší úrovní genové mutace imunoglobulinových genů. Porucha apoptózy leukemických buněk pravděpodobně neexistuje od počátku. K leukemizaci dochází, protože je buňka aktivována k přežití podněty z vnějšího prostředí prostřednictvím BCR. CLL jako onemocnění z akumulace lymfocytů je navíc provázeno proliferační aktivitou, která se dříve nepředpokládala (35).

Většina nádorových buněk CLL je v klidové fázi G0/G1 buněčného cyklu a má jen malou proliferační aktivitu, což je unikátní vlastnost, která CLL odlišuje od jiných typů nádorových onemocnění. Patogenetické mechanismy, které jsou dosud známy, zahrnují jak vnější události (např. stimuly mikroprostředí, antigenní stimulaci), tak vnitřní události (genetické a epigenetické), které mají zásadní vliv na vývoj a transformaci onemocnění (36).

Pochopení patogenetických mechanismů podílejících se na vývoji CLL pomohlo rozdělit nemoc do podskupin s rozdílnou prognózou a přežitím nemocných. Zásadní byl objev somatických mutací ve variabilní oblasti

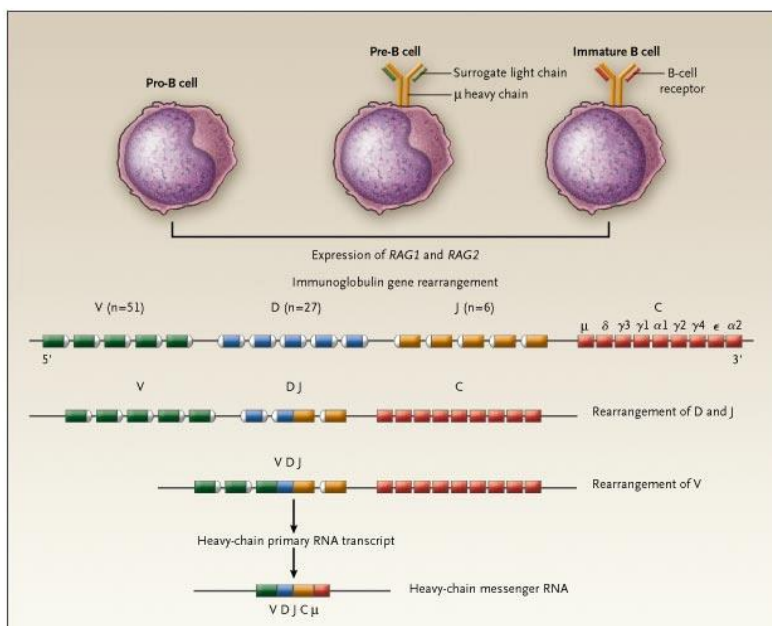
imunoglobulinových genů pro těžký řetězec *IGHV* (27, 37) . Stejně důležité bylo zjištění, že CLL buňky s daným typem *IGHV* mohou být nositelkami stereotypních receptorů BCR (38-40). To naznačuje podstatný podíl vlivu antigenů na patogenezi nemoci. Byly identifikovány genomické aberace, epigenetické modifikace , genové mutace a deregulace mikroRNA, které vedly k pochopení vývoje a transformace onemocnění (41-45). Klinické studie pak prokázaly prognostický význam uvedených změn (43, 44, 46, 47).

#### 4.1. BCR receptor

BCR je v patogenezi onemocnění intenzivně studován již dlouhou dobu. BCR je imunoglobulin v membránové formě. Zralý B lymfocyt vykazuje jeho přítomnost na povrchu buňky a jeho úloha spočívá v rozpoznání antigenu a následné produkci protilátek, čímž je BCR nezbytný pro přežití a proliferaci lymfocytů.

Geny kódující imunoglobulinové řetězce se skládají z mnoha segmentů, které jsou v průběhu zrání lymfocytu přeskupovány. Části genu, které kódují variabilní oblast imunoglobulinu, jsou tvořeny V, D a J segmenty. Díky jejich přestavbě (VDJ rekombinaci) se B lymfocyty liší genovou výbavou. Rekombinace zajišťuje kódování 27 900 000 variant molekul imunoglobulinů (Obrázek 2). Rekombinace současně vede k zadání a k diferenciaci B lymfocytu. Jakmile je vybrána jedna varianta BCR, zůstane tato v genomu a ostatní jsou nenávratně odstraněny. Imunoglobuliny, které potom B lymfocyt produkuje, mají u dané buňky a jejího potomstva zcela konkrétní a neměnnou strukturu.

U CLL neodpovídá frekvence jednotlivých VH genů frekvenci zastoupení u normálních B lymfocytů. Některé strukturní prvky jsou zastoupeny častěji (*IGHV1-69*), některé jsou asociovány se špatnou prognózou (*IGHV3-21*) (48).



**Obrázek 2: VDJ rekombinace** (Chiorazzi a kol., 2005) (35)

VH3, VH1, VH4 segmenty se u CLL vyskytují častěji než jiné (49). Tento průkaz restrikce potvrzuje nespornou roli BCR v iniciaci a rozvoji onemocnění (35, 50). Stimulace a selekce antigenem se tak podílí na patogenezi nemoci (51, 52). Dal-Bo nazývá antigen jako vnější prognostický faktor onemocnění (53). Znalost signalizace BCR vedla k úvaze o možnosti terapeutického ovlivnění, resp. možné inhibici jednotlivých molekul signální buněčné dráhy (54).

#### 4.2. Mutace *IGHV* genů

Dalším rekombinačním procesem v průběhu zrání B lymfocytu jsou somatické hypermutace (SHM). V lymfatické uzlině nebo v periferní krvi dochází po styku s antigenem v germinálním centru k SHM, a tím k tvorbě funkčního BCR v nezralé buňce. Do variabilních oblastí přeskupených imunoglobulinových genů pro těžký i lehký řetězec jsou vnášeny mutace, SHM, jejichž cílem a úkolem je zvýšit afinitu BCR receptoru k antigenu. Izotypový přesmyk je poslední rekombinace, kdy dochází k tvorbě funkčního BCR ve zralé buňce. Je vytvořena membránová nebo solubilní forma imunoglobulinu.

Za nemutovaný gen *IGHV* je považován ten, který má více než 98 % shodu se sekvencí germinální linie, naproti tomu tam, kde je přítomno více než 2% mutací, je stav hodnocen jako mutovaný *IGHV*.

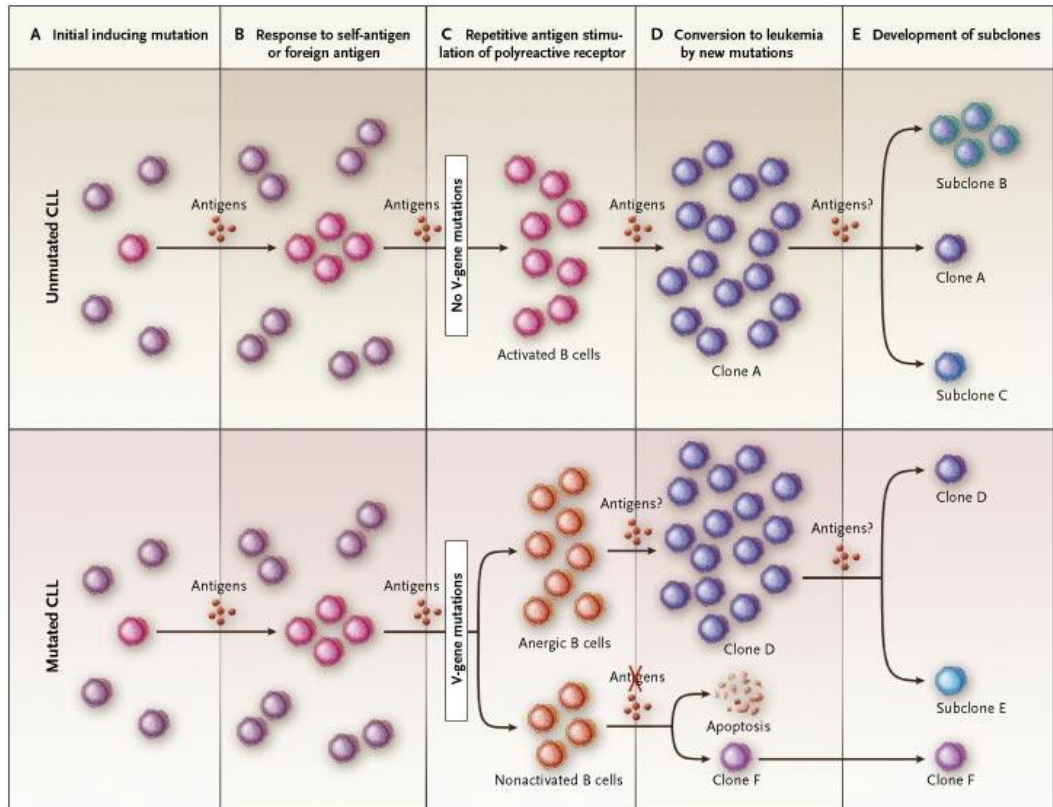
Přítomnost či absence SHM *IGHV* definuje dva biologicky a prognosticky odlišné subtypy chronické lymfocytární leukémie. Prvním subtypem je onemocnění s mutovaným stavem *IGHV* genu (vycházející z postgerminálního B lymfocytu), druhým subtypem je onemocnění s nemutovaným stavem *IGHV* genu (vycházející z pregerminálního B lymfocytu).

V obou případech je podkladem klonálního vývoje antigeně stimulovaný zralý lymfocyt, který různou měrou aktivně prolifерuje a tato prolifерace je následně předpokladem vzniku a hromadění dalších genetických aberací.

B lymfocyty s mutovaným stavem *IGHV* jsou vysoce specifické vůči antigenní stimulaci a pro své nositele představují prognosticky příznivý průběh onemocnění.

Snadnou antigenní stimulací BCR u buněk s nemutovaným stavem *IGHV* genu dochází ke spuštění dalších signálů potřebných k přežití buňky, dochází k produkci chemokinů, aktivaci stromálních buněk, T lymfocytů, NK buněk. U pacienta s mutovaným stavem *IGHV* je obecně malá schopnost BCR vázat antigen a k další signalizaci v buňce nedochází. Model vývoje CLL buněk, roli antigenní stimulace BCR, vliv na mikroprostředí a aktivaci signálních drah jsou zobrazeny na následujících obrázcích (Obrázek 3A,B, 4, 5).

V roce 2009 publikovaná práce autorů Dal-Bo a kolektiv rozděluje s ohledem na patogenezi onemocnění prognostické markery na tzv. vnitřní a vnější. K vnitřním faktorům patří změny karyotypu a k faktorům vnějším patří BCR: nemutovaný stav *IGHV*, stereotypní receptory a některé subgeny, např. *IGHV3-21*, protein ZAP-70 a CD38 antigen (Obrázek 4) (35, 36, 53).



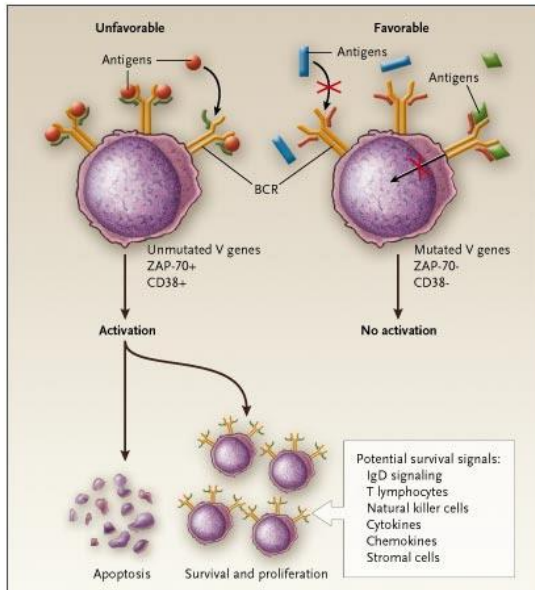
**Obrázek 3A: Model vývoje CLL buněk:**

(A) Počáteční genetická léze v jednom jediném B lymfocytu (v obrázku růžová buňka) mezi miliardami normálních B lymfocytů. Následuje interakce antigenu a BCR, což vyvolá klonální expanzi.

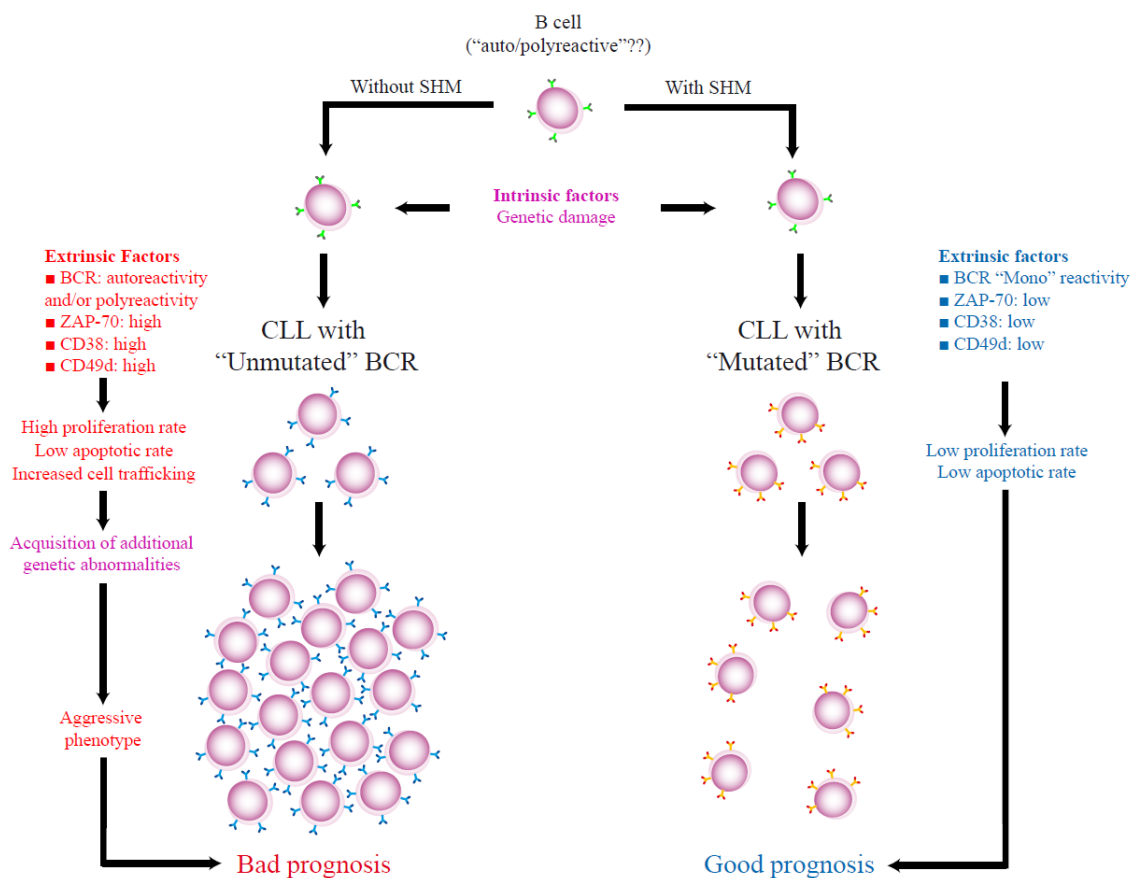
(B) V klonu s nemutovaným *IGHV* po reakci antigenu a polyreaktivní BCR dochází ke klonálnímu růstu.

(C) V klonu s mutovaným *IGHV* vedou mutace ke ztrátě polyreakтивности, tj. začínají původní antigen vnímat jako autoantigen.

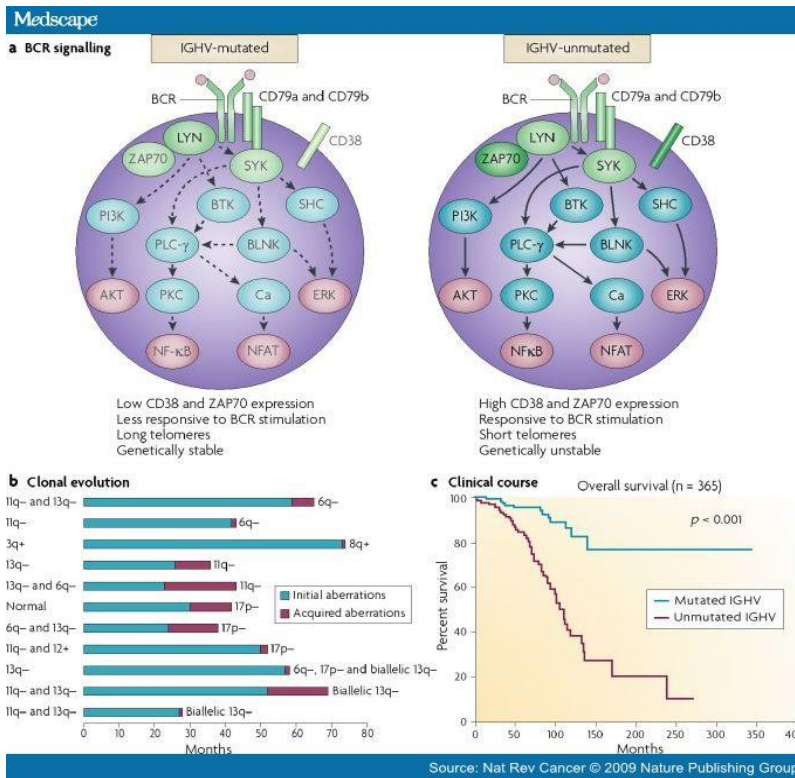
(D) Překročení hranice mezi normálním B lymfocyt a lymfocyt nádorovým. Rozdíly v polyreaktivě BCR vedou pak k rozsahu klonální expanze. Až v následujícím vývoji dochází ke genetickým změnám (např. delecí 11q nebo delecí 17p a k vývoji subklonů (E) (Chiorazzi a kol. 2005) (35)



**Obrázek 3B: CLL s nemutovaným stavem *IGHV* – stimulace antigeny přes BCR.** (Aktivace buněk vede buď k apoptóze nebo k přežití a proliferaci. U lymfocytů s mutovaným stavem *IGHV* dojde k omezení schopnosti vázat antigen, ke ztrátě signalizace BCR receptoru) (Chiorazzi a kol. 2005) (35).



**Obrázek 4: Vnější a vnitřní prognostické faktory CLL** (prognostické faktory vycházející z poznání patogeneze onemocnění) (Dal-Bo a kol., 2009) (53)



**Obrázek 5 : CLL s nemutovanými a mutovanými geny *IGHV***

a. U nemutovaného stavu *IGHV* je vyšší hladina ZAP-70 a exprese CD38, snazší aktivace klíčových signálních drah v reakci na BCR aktivaci např. tyrosinových kináz Lyn, Syk, a dále odlišný profil genové exprese. U mutovaného *IGHV* je tato signalizace snižena (označeno přerušovanými šipkami), je delší teloméra a onemocnění je geneticky stabilnější.

b. Pacienti s nemutovaným stavem *IGHV* mají větší pravděpodobnost vzniku nepříznivých genetických změn (delece 11q a 17p). Graf uvádí u pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* trvání iniciálních aberací a vznik dalších získaných aberací.

c. Tyto biologické rozdíly vysvětlují různé celkové přežití pacientů. V souboru pacientů nebyl medián přežití nemocných s mutovaným stavem *IGHV* dosažen, u pacientů s nemutovaným *IGHV* byl medián přežití 111 měsíců (Zenz a kol 2010) (36).

Vysvětlivky: BLNK – B cell linker protein, BTK – Brutonova tyrosin kináza, Ca – vápník, NF- $\kappa$ B – nukleární faktor- $\kappa$ B, NFAT – nukleární faktor aktivovaných T lymfocytů, PLC- $\gamma$  – fosfolipáza C- $\gamma$ , PKC – protein kináza C, PI3K – fosfatidylinositol 3-kináza.



### 4.3. ZAP-70 a CD38

ZAP-70 je tyrosinkináza. Byla studována poprvé v souvislosti s aktivací T buněčného receptoru antigenem. Fyziologicky je exprimována v určitých stádiích vývoje B lymfocytu a u nádorových B lymfocytů CLL. Její zvýšená hladina byla popsána u lymfocytů s nemutovaným stavem *IGHV*. ZAP-70 ovlivňuje signalizaci BCR přes asociované molekuly (55). Také povrchový antigen CD38 se zúčastní aktivace BCR společně se ZAP-70. Signalizaci BCR receptoru intracytoplazmaticky zajišťují kinázy Lyn a Syk, následované aktivací MEK/ERK, PI3K, PKC a dalšími. U CLL lymfocytů byla popsána abnormální aktivace těchto kináz, které vedou k inhibici apoptózy a to bez ohledu na vazbu antigenu na BCR receptor. Inhibice těchto kináz vede k apoptóze CLL buněk (56).

### 4.4. Porucha apoptózy, gen *p53*

Existenci paměťových, dlouhodobě žijících buněk zajišťuje přísná regulace apoptózy. V krvi pacientů s CLL kolují zejména buňky v klidové fázi buněčného cyklu, což je umožněno relativní převahou antiapoptotických mechanismů. Jako antiapoptotický protein je uváděn Bcl-2, který je u CLL skutečně zvýšeně exprimován (57). Ukázalo se ale, že jeho zvýšená exprese nemá u CLL prognostický význam, rozhodující je ale poměr molekul Bcl-2/Bax, ale to pouze u některých studií (58, 59). Dále byla u buněk CLL popsána zvýšená hladina antiapoptotického proteinu Mcl-1. Kitada a kolektiv provedli analýzu exprese Bcl-2 proteinů, Mcl-1, Bax, Bak, Baf ve vztahu k in vitro a in vivo odpovědi na terapii chlorambucilem a fludarabinem. S rezistencí na terapii nejvíce souvisela exprese Mcl-1 (59). Vysvětlení zvýšení exprese těchto proteinů je několik a jsou stálým předmětem výzkumu. Rozhodující je možnost jejich ovlivnění, to znamená nalezení nových účinných látek fungujících jako inhibitory zvýšené exprese těchto proteinů (54).

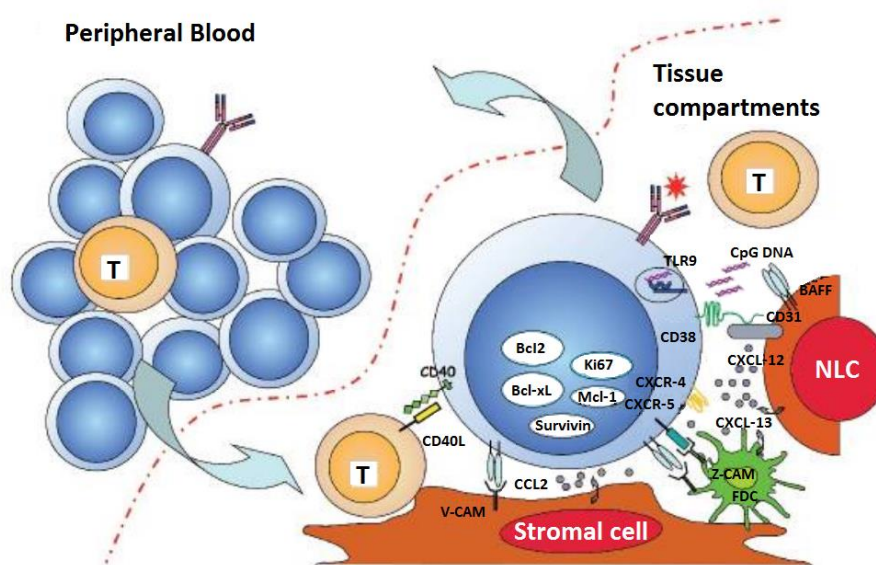
Na krátkých ramenech chromosomu 17 a to na 13. úseku, se nachází gen *p53*, který hraje zásadní roli v zástavě buněčného cyklu, indukci apoptózy po předchozí identifikaci poškozených oblastí DNA zlomy. Gen *p53* je tedy významný antionkogen chránící genom (60). Většina nádorů má poškozenou dráhu *p53* delecí, tj. ztrátou genu, mutací nebo jinými mechanismy. K vyřazení

funkčnosti *p53* stačí delece jedné alely (61). Onkogenní vlastnosti mají také bodové mutace *p53*, kdy dochází k expresi proteinů, které mají onkogenní charakter (62). Frekvence výskytu *p53* abnormalit u hematologických onemocnění je ve srovnání se solidními nádory poměrně nízká. V závislosti na stádiu onemocnění se pohybuje kolem 5 %, u rezistentních a pokročilých onemocnění může být výskyt až 25–40 %. I když četnost defektů nebývá vysoká, jsou defekty *p53* v multivariantních analýzách jednoznačně nejvýznamnějším nezávislým negativním prognostickým faktorem (63, 64). Přítomnost abnormalit *p53* je také spojena s vyšší pravděpodobností transformace onemocnění (65). Práce zabývající se *p53* mutacemi prokázaly negativní prognostický význam mutací ve vztahu k přežití a odpovědi na terapii (66-68). Současně byla vyslovena hypotéza, že nárůst *p53* mutací v průběhu sledování a léčby pacienta je dána selekcí rezistentního klonu s inaktivovaným *p53*. Před zahájením terapie může být *p53* přítomen v nedetekovatelné frakci buněk (66, 68). Malčíková a kolektiv ve své práci ukázali, že také terapie alemtuzumabem, která působí nezávisle na dráze *p53*, může selektovat klony s inaktivním *p53*, neboť po eradikaci původního klonu mají buňky s *p53* výraznou selekční výhodu (67).

#### 4.5. Mikroprostředí, angiogeneze

Buňky CLL při kultivaci in vitro velmi brzy podléhají apoptóze, přičemž in vivo jsou vůči apoptóze odolné (69). Mezi buňkami CLL a T lymfocyty, endoteliemi, buňkami stromálními, „nurse-like“ buňkami a dendritickými buňkami v mikroprostředí kostní dřeně, uzlin a sleziny dochází jednak buněčným kontaktem a jednak prostřednictvím cytokinů k vzájemným interakcím, které pomáhají v přežití buněk CLL inhibicí apoptózy. Tato místa v kostní dřeni a uzlinách slouží CLL lymfocytům jako výklenky (niches), kde mají ideální podmínky pro další přežití. Mezi hlavní interakce patří CD40-CD40 ligand (CD154), chemokiny a jejich receptory a signální dráhy začínající u BCR (Obrázek 6) (51, 70). Maligní buňky unikají apoptóze, programové smrti buňky několika mechanismy: expresí antiapoptotických receptorů a jejich ligandů, defekty v signálních drahách např. FAS a TRAIL a aktivními antiapoptotickými drahami, tj. NF- $\kappa$ B a PI3K (71). Signální molekuly ZAP-70 a CD38 ovládají

migraci leukemických buněk (72). Přežití leukemických buněk pomáhají stromální buňky, autologní T lymfocyty, signální molekuly, např. solubilní CD40 ligand (73). O CLL se v současnosti mluví jako o onemocnění, kde buňky v klidové fázi choroby cirkulují v periferní krvi, zatímco proliferující buňky nemoci tvoří v příhodném prostředí lymfatických orgánů proliferací centra, tzv. pseudofolikly (74). V interakcích mezi lymfocyty CLL a mikroprostředím hrají důležitou roli chemokiny, studována je jich celá řada. Významná signální dráha, která se účastní migrace a proliferace CLL buněk je CD31/CD38/ZAP-70. ZAP-70 je současně aktivován z BCR na povrchu lymfocytu při stimulaci antigenem (51, 54).



**Obrázek 6: CLL a vliv mikroprostředí (Caligaris a kol. 2011) (70)** NLC: nurse-like cell, FDC: follicular dendritic cell

Je známo, že angiogeneze, novotvorba cév hraje zásadní roli v metastazování solidních nádorů, u hematologických malignit zahrnujících také CLL, byl její význam prokázán později (75). Lymfocyty CLL jsou schopny produkovat řadu pro- a anti-angiogenních látek. Angiogenní proces je dán interakcemi maligních buněk a endotelií (76). Jako angiogenní ukazatele, tzv. cirkulující angiogenní faktory, jsou uváděny bazický růstový faktor pro fibroblasty (bFGF) a cévní endotelový růstový faktor (VEGF) (77, 78). Studie Smoleje a kolektivu zjistila významně vyšší plazmatické koncentrace solubilního endoglinu (sCD105) jako součást receptorového systému TGF- $\beta$  (transformující

růstový faktor- $\beta$ ). Tyto pak byly korelovány s klinickým stádiem onemocnění a dobou bez progresu onemocnění (79).

Další práce, které se týkají angiogeneze, se snažily prokázat novotvorbu cév v kostní dřeni (80). Nicméně výsledky některých dalších studií na tomto poli jsou nejednoznačné. To, co je ale významné, je studium mikroprostředí jako možného terapeutického cíle (75).

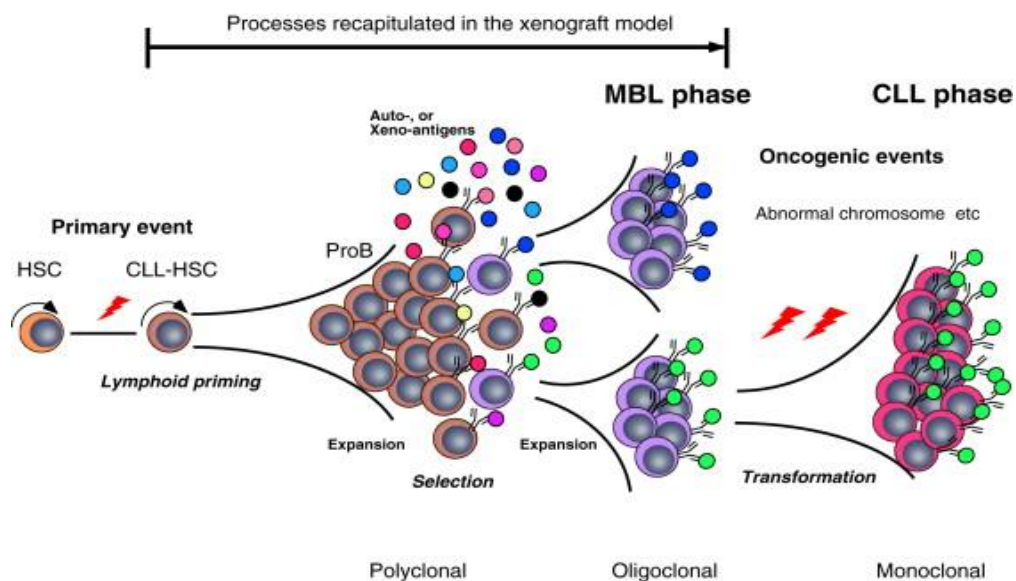
#### 4.6. MicroRNA

Znalosti o regulaci genové exprese doplnily znalosti o úloze malých nekódujících molekul RNA (microRNA), které tvoří 3–5 % všech genů v genomu. Mnohé studie popisují u různých hematologických malignit aberantní expresi microRNA. Stěžejní byly práce, které dokládají lokalizaci miR-15a a miR-16-1 v oblasti 13q14, kde u CLL pacientů je jejich exprese snižena nebo je prokázána delece (41). Další, miR-29c a miR-181 se podílejí na poruše apoptotických procesů, regulují Tc11 proto-onkogen a Mcl-1. U pacientů s delecí nebo mutací *p53* byla popsána specifická exprese miR-34a. Předpokládá se, že miRNA hrají podstatnou roli v kancerogenezi onemocnění (41, 81, 82).

#### 4.7. Primární místo patogeneze CLL

V roce 2011 v *Cancer Cell* publikoval Kikushige a kolektiv článek týkající se primárního místa patogeneze CLL (83). Tímto místem je buňka schopná sebeobnovy. Poznatky byly získány pokusy s transplantací kmenových buněk pacientů s CLL (HSC) imunodeficitní myši. Tyto HSC mají zvýšený sklon tvořit polyklonální B buněčné progenitory, následně vyzávat v mono- a oligo- klony s fenotypem podobným CLL. Klonální selekce vzniká na úrovni zralého B lymfocytu. HSC nemají chromosomální abnormality obvykle související s patogenezí CLL. B klon vzniklý u imunodeficitní myši je nezávislý na originálním klonu CLL, má vlastní rekombinace *VDJ* imunoglobulinových genů, přednostně ty, které jsou častější u lidské CLL (VH1, VH3 a VH4). Při dalších pokusech byly myším transplantovány subpopulace CLL buněk CD19+ ve snaze rozpoznat spouštěcí buněčnou fázi vývoje onemocnění, ale ani po 6 měsících po transplantaci se neobjevily u příjemců lidské CLL buňky. Pokud byly HSC

transplantovány více myším, docházelo k selekci různých klonů náhodně v rámci polyklonality. V experimentu bylo dále prokázáno, že HSC jsou schopny sebeobnovy, pokud byly přeneseny od primárního sekundárnímu příjemci. Sekundární příjemce vytvořil klony nezávislé na primárním příjemci. Pokud CLL buňky pacientů měly genetické aberace zapojené do patogeneze CLL, u HSC se tyto abnormality nevyskytovaly, což vypovídá o tom, že chromosomální abnormality buňka získá až na úrovni zralého lymfocytu, tj. dodatečným leukemogenním impulzem po transformaci do klinické CLL. Fakt, že HSC tvoří monoklonální nebo oligoklonální B buněčné populace nasvědčuje tomu, že má vlastní buněčné abnormality. Nedávno byla popsána významná exprese genů pro IKZF1 (IKAROS), které jsou časným lymfoidním transkripčním faktorem u CLL-HSC a nejspíše tak i obrazem jejich vlastního buněčného primingu do buněčné linie (Obrázek 7) (83).



**Obrázek 7: Primární místo patogeneze CLL: kmenová buňka** (Kikushige a kol. 2011) (83)

#### 4.8. Monoklonální B lymfocytóza

V současnosti je na monoklonální B lymfocytózu (MBL) nahlíženo jako na předstupeň vývoje CLL a v této souvislosti slouží jako určitý model ke studiu vývoje onemocnění.

Diagnóza CLL je podmíněna minimálním množstvím B lymfocytů. Díky moderním technologiím flowcytometrie jsou i u zdravých jedinců nacházeny

klony B lymfocytů podobné CLL. Proto byla vydělena jednotka, která je definována přítomností klonálních B lymfocytů v periferní krvi v počtu menším než  $5 \times 10^9/l$ , celkový  $\kappa:\lambda$  poměr je  $> 3:1$  nebo  $< 0,3:1$  nebo  $> 25\%$  z B lymfocytů má nízkou expresi povrchových imunoglobulinů či specifický imunofenotyp pro CLL. Opakovaným vyšetřením po 3 měsících musí být diagnóza MBL potvrzena. Podmínkou je nepřítomnost lymfadenopatie a organomegalie nebo nepřítomnost současného autoimunitního nebo infekčního onemocnění, nebo jiného příznaku lymfoproliferativního onemocnění (3). Exprese znaku CD5 dělí MBL na 2 podskupiny.

Rawstron a kolektiv studoval u 1520 lidí s normálním krevním obrazem a 2228 lidí s lymfocytózou  $> 4 \times 10^9/l$  ve věku 62–80 let výskyt MBL, soubor následně sledoval bezmála 7 let. MBL byla detekována u 5,1 % jedinců s normálními počty lymfocytů a 13,9 % osob s lymfocytózou. Stejně často jako u CLL byly nalezeny cytogenetické změny trisomie 12 a delece 13q. Naopak delece 11q nebo delece 17p se vyskytovaly pouze u 9 % MBL s lymfocytózou. Mutovaný stav *IGHV* byl nalezen u 88 % pacientů s MBL nezávisle na lymfocytóze. Pravděpodobnost progresu MBL do aktivní CLL vyžadující léčbu byla 1 % ročně (4).

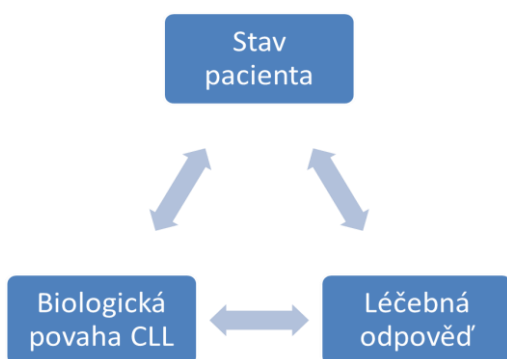
Další studií na 77 tisících testovaných zdravých lidí bylo zjištěno, že výskytu CLL v 98 % předchází MBL (3).

## 5. Prognostické faktory

Prognostické faktory bývají děleny na konvenční či tradiční a nové, někdy označované jako biologické. Konvenční prognostické faktory jsou určeny nejen pro orientaci o prognóze choroby v každodenní praxi, ale stádium onemocnění a LDT jsou i dnes při znalosti řady nových biologických prognostických markerů jediné prognostické faktory, které rozhodují o indikaci k léčbě onemocnění.

Je zřejmá snaha všech, kteří se zabývají péčí o pacienty s CLL, hledat a kombinovat klasické a další nové, biologické prognostické faktory, včetně vytváření indexů a skórovacích systémů, podobně jako u pacientů s NHL a CML. Význam nových prognostických faktorů je zejména v tom, že pomáhají stanovit prognózu v časných klinických stádiích onemocnění Binet A (Rai 0-I) a umožňují tak včas odhalit ty pacienty, u nichž je vysoké riziko časný progres onemocnění. Potřeba bližšího prognostického zařazení je dána tím, že plně tři čtvrtiny pacientů jsou v dnešní době diagnostikovány v časném stádiu choroby (Binet A).

Obecně lze říci, že pro stanovení individuální prognózy jednoho konkrétního pacienta je rozhodující celkový stav pacienta, biologická povaha CLL a stupeň dosažení (případně nedosažení) léčebné odpovědi (Obrázek 8). (84).



**Obrázek 8: Stanovení individuální prognózy pacienta**

## 5.1. Konvenční prognostické faktory

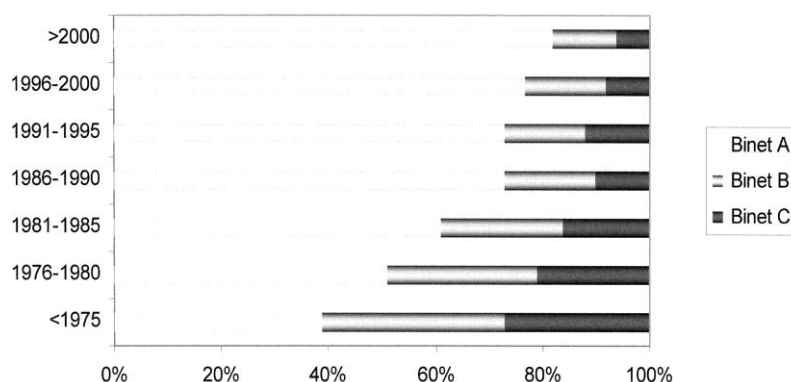
Mezi konvenční prognostické faktory patří klinické stádium onemocnění stanovené dle systému navrženého Raiem nebo Binetem, věk nemocného, pohlaví, klinický stav pacienta, počet lymfocytů a jejich morfologie v periferní krvi, zdvojovací čas lymfocytů a typ infiltrace kostní dřeně (20, 21). Performance status (PS) je definován jako stav celkové fyzické aktivity nemocného (85). Může být hodnocen škálou dle ECOG nebo WHO nebo Karnofského indexem.

### 5.1.1. Klinické stádium onemocnění

Modifikovaná klasifikace dle Raie dělí pacienty do 3 skupin: do nízkého, středního a vysokého rizika. Srovnání původního rozdělení klinických stádií dle Raie a modifikovanou klasifikaci přináší tabulka (Tabulka 2).

Klinické stádium dle Bineta dělí pacienty a rizikové skupiny podle počtu skupin postižených uzlin a s ohledem na hodnoty hemoglobinu a počty trombocytů. Přežití pacientů v jednotlivých prognostických skupinách se také významně liší (Tabulka 2). Stážovací systémy mají své limity, když nezohledňují příčinu cytopenie, např. anémii nebo trombocytopenii imunitní etiologie.

Díky dřívější diagnostice onemocnění se s posledních třiceti letech mění poměr zastoupení pacientů ve prospěch nemocných diagnostikovaných v časném stádiu onemocnění Binet A (Graf 3) (86).



**Graf 3: Změna zastoupení časného stádia onemocnění Binet A za posledních 30 let (Montserrat a kol., 2006) (86)**



**Tabulka 2: Klinické stážovací systémy dle Raie, modifikace dle Raie a stážování dle Bineta**

Stádium dle Raie		Riziko	Medián přežití (měsíce)
0	Lymfocytóza	Nízké	> 150
I	Lymfocytóza + Lymfadenomegalie	Střední	101
II	Lymfocytóza + spleno- nebo hepatomegalie	Střední	71
III	Lymfocytóza + anémie <sup>1</sup>	Vysoké	19
IV	Lymfocytóza + trombocytopenie <sup>2</sup>	Vysoké	19
Stádium dle Bineta			
A	< 3 postižené skupiny uzlin <sup>4</sup>	Nízké	Nestanoven
B	≥ 3 postižené skupiny uzlin	Střední	84
C	Anémie <sup>3</sup> a/nebo trombocytopenie <sup>2</sup>	Vysoké	24

<sup>1</sup> Hemoglobin < 110 g/l

<sup>2</sup> Trombocyty < 100×10<sup>9</sup>/l

<sup>3</sup> Hemoglobin < 100 g/l

<sup>4</sup> Skupiny uzlin: axilární, krční, tříselné, slezina a játra

### 5.1.2. Zdvojevací čas lymfocytů

Zdvojevací čas lymfocytů (LDT) je doba, za kterou dojde ke zdvojnásobení počtu lymfocytů v periferní krvi. V časných klinických stádiích onemocnění je LDT pod 12 měsíců spojen s horší prognózou onemocnění a kratším přežitím. V klinické praxi slouží sledování počtu lymfocytů v čase u daného pacienta jako jeden z indikátorů nutnosti zahájení terapie, LDT pod 6 měsíců je známkou klinické aktivity onemocnění a je důvodem k zahájení terapie. Vždy je však také třeba vyloučit jiný důvod nárůstu počtu lymfocytů u pacienta, a to zejména infekční příčinu (87-89).

### 5.1.3. Typ infiltrace kostní dřeně

Typ infiltrace kostní dřeně odráží obecně velikost nádorové nálože. Difuzní typ infiltrace kostní dřeně představuje pro pacienta nepříznivou prognózu informací (90). Avšak v současnosti se standardně trepanobiopsie u pacientů s CLL ke zhodnocení stupně infiltrace kostní dřeně jako markeru prognózy nevyšetřuje, neboť prognostickou informaci přináší mnohé další faktory.

Přesto je provedení trepanobiopsie dle doporučení Halleka považováno za vhodné (1).

#### 5.1.4. Věk a pohlaví

Muži mají dle některých prací horší přežití než ženy (91). Mužské pohlaví jako nepříznivý prognostický faktor pro přežití pacientů s CLL však není všeobecně přijímán (92, 93).

Mnohé studie uvádí pokročilý věk jako nepříznivý prognostický faktor. Věk je obecně v populaci prognostický faktor přežití. Ve studii Molica a kolektiv z roku 1994 měli mladší pacienti delší přežití než pacienti starší. Když se ale ze srovnání vyjme skupina pacientů, která zemřela na komorbiditu kardiovaskulární a komorbiditu spojenou se sekundárními tumory, pak se výhoda lepšího přežití mladších nemocných s CLL ztrácí (94).

Za stěžejní práci na toto téma lze považovat studii, kde autoři publikovali soubor 1011 pacientů (20 % pacientů ve věku < 55 let). Pravděpodobnost celkového přežití byla 10 let a byla stejná u obou podskupin. Skupiny se však významně lišily v příčině úmrtí, mladší pacienti umírali častěji na CLL, starší na sekundární malignity a přidružené choroby. Relativní riziko úmrtí na CLL je tedy v mladší věkové skupině vyšší (95). Nejnovější práce v éře používání moderních prognostických markerů a chemoimunoterapie publikovaná v roce 2014 se týká popisu onemocnění pacientů pod 55 let věku. Celkem bylo studováno 844 pacientů pod 55 let věku. Ve srovnání s pacienty nad 55 let měli kratší dobu do nutnosti zahájení léčby (4 vs 5,2 let), ale delší přežití (12,5 vs 9,5 let). Pokud byla skupina pacientů s CLL pod 55 let srovnána s podobnou skupinou zdravých jedinců, pak bylo její přežití kratší (96).

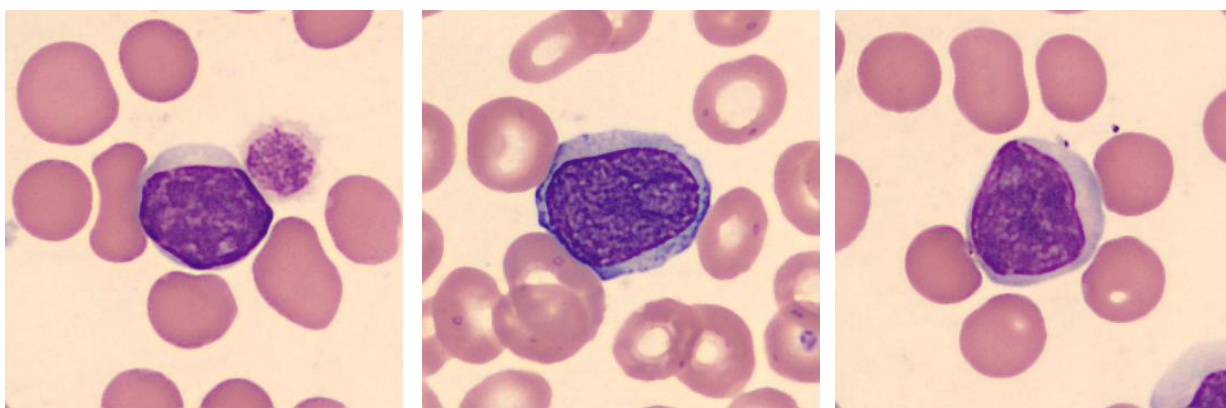
#### 5.1.5. Počet lymfocytů v periferní krvi

Všeobecně je udávaná hranice významná pro prognózu mezi  $40\text{--}50 \times 10^9/l$  lymfocytů. Počet lymfocytů v periferní krvi je významným prediktorem přežití pacientů nezávisle na klinickém stádiu onemocnění. Ve studii z roku 1982 Baccarani a kolektiv prokázali, že přežití pacientů ve stádiu Rai I a II s počtem lymfocytů  $> 40 \times 10^9/l$  bylo kratší ve srovnání s pacienty s počtem lymfocytů  $< 40 \times 10^9/l$  a to bez ohledu na věk (97). Také další recentní studie prokazují v

univariantní analýze prognostický význam zvýšení počtu lymfocytů  $\geq 50 \times 10^9/l$  (93).

#### 5.1.6. Morfologie lymfocytů

Morfologická heterogenita lymfocytů CLL je případ od případu značná (Obrázek 9). Byla popsána řada morfologických variant lymfocytů, jejich vliv na prognózu je však z dnešního pohledu kontroverzní. Ve studiích byl popsán vliv absolutního i relativního zvýšení počtu prolymfocytů na prognózu nemocných (2, 98, 99).



**Obrázek 9: Atypické lymfocyty a prolymfocyt u pacienta s CLL (prolymfocyt je buňka uprostřed).** Zdroj: foto Anna Lapčíková; archiv HOK FN Olomouc

#### 5.2. Biologické prognostické markery

Jako nové jsou označovány sérové a další biologické markery. Mnohé z nich jsou prostudované detailně a patří k nim sérové markery: beta-2 mikroglobulin (B2M), sérová thymidinkináza (sTk), solubilní CD23, mutační stav *IGHV*, *IGHV3-21* subgen, genetické změny delece 11q a delece 17p, pozitivita povrchového antigenu CD38 a pozitivita exprese ZAP-70.

V současnosti jsou intenzivně studované genové mutace *p53*, *BIRC3*, *SF3B1* a *NOTCH1*. Mnohé faktory další studium vyžadují. Mezi takové patří chromosomální translokace, exprese CLLU1, micro-RNA, protein Tcl-1, exprese Mcl-1, poměr Bcl-2/Bax, VEGF, trombopoetin, délka telomér a telomerázová aktivita. Mezi nové prognostické faktory lze počítat také stupeň stanovení odpovědi na léčbu, tzv. stanovení minimální reziduální nemoci (MRD) (84).

Studován je také prognostický význam CT vyšetření. V poslední době jsme svědky snahy výzkumných týmů o konstrukci komplexních prognostických indexů (93, 100-102).

Před uvedením do klinické praxe musí prognostické faktory splňovat řadu požadavků. Je nutné ověření jejich platnosti na velké skupině pacientů, provedení prospektivních studií, ověření prognostického významu faktoru v multivariantní analýze ve vztahu k zavedeným markerům. Je nutné studium významu markeru ve vztahu k podané léčbě, k vývoji choroby a jeho podíl na případné klonální evoluci. Většina experimentálně ověřených prognostických znaků se do rutinní diagnostiky nedostane, ale jsou nesmírně cenné ve studiu patogeneze onemocnění.

#### 5.2.1. Beta-2-mikroglobulin (B2M)

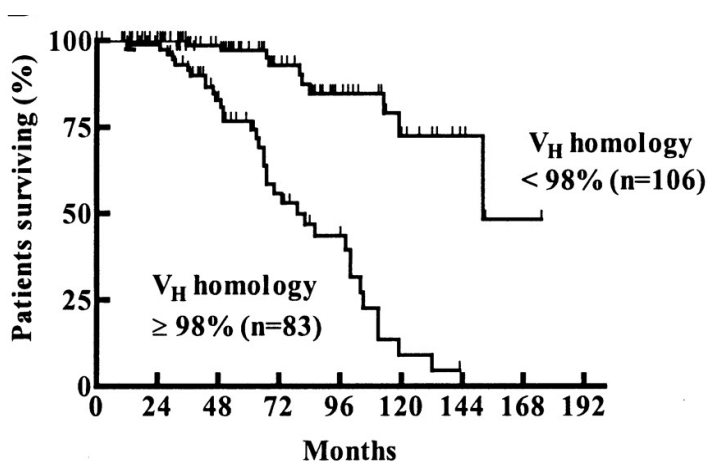
B2M, protein nízké molekulární hmotnosti, je spojen s HLA komplexem antigenu I. třídy. Zvýšení hladiny B2M je asociováno s větší nádorovou masou a kratším intervalem do progresu onemocnění (103, 104). V roce 2009 byla Wierdou publikována práce, která studovala 595 pacientů, indikovaných k primární léčbě. Práce studovala prediktory dosažení kompletní remise a prediktory celkového přežití. Pro celkové přežití měla význam hodnota B2M, věk pacienta a léčebný režim. Do studie byli zařazeni pacienti léčení fludarabinem, dále režimen s fludarabinem a cyklofosfamidem nebo mitoxantronem (FC/FM) a režimem s fludarabinem, cyklofosfamidem a rituximabem (FCR). Lépe přežívali pacienti léčení FCR, nemocní mladší a nemocní s nízkou hodnotou B2M. Nízké hodnoty B2M jsou také asociovány s vyšším stupněm léčebné odpovědi (64).

#### 5.2.2. Sérová tymidinkináza (sTk)

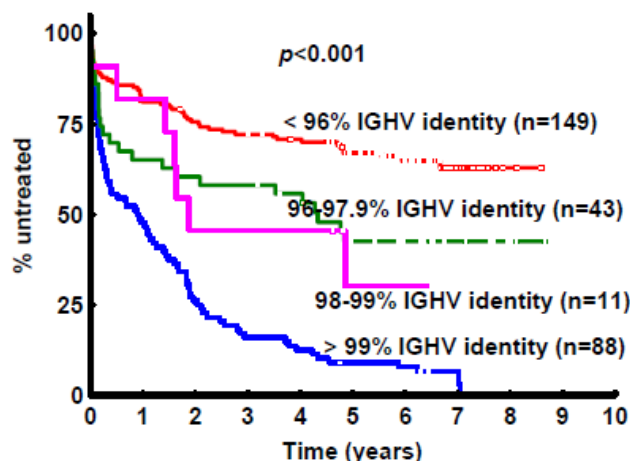
V roce 1999 publikoval Hallek práci, kde multivariantní regresní analýzou u 122 neléčených pacientů ve stádiu Binet A prokázal nezávislou prognostickou informaci pravděpodobnosti časně progresu onemocnění v případě přítomnosti lymfadenomegalie, při počtu lymfocytů nad  $75 \times 10^9/l$  a při vyšší hodnotě sTk nad 7,1 U/L. U pacientů se sTk > 7,1 U/L ve stádiu Binet A byl interval do progresu onemocnění (PFS) 8 měsíců, u pacientů Binet A s hodnotou sTk < 7,1 U/L byl PFS 49 měsíců (105).

### 5.2.3. Mutační stav *IGHV*

V roce 1999 Hamblin a kolektiv popsali soubor 84 pacientů a zjistili, že nemutovaný stav *IGHV* genu je asociován s agresivnějším průběhem onemocnění. 38 pacientů souboru mělo stav *IGHV* nemutovaný a 46 pacientů stav *IGHV* mutovaný. Nemutovaný stav byl signifikantně častěji spojen se subgenem *IGHV1-69* a D3-3, atypickou morfolofií, trisomií chromosomu 12, pokročilejším stádiem onemocnění a časněji progredující chorobou. Přežití pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* bylo 117 měsíců, s mutovaným stavem *IGHV* 293 měsíců ( $p=0,001$ ) (27). Damle a kolektiv v témže roce publikovali práci, kde srovnávali soubor pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* a  $\geq 30\%$  pozitivitou povrchového antigenu CD38 oproti pacientům s mutovaným stavem *IGHV* a negativitou CD38. První skupina měla statisticky častější horší odpověď na podanou chemoterapii, ve druhé skupině pacienti často léčbu nevyžadovali a měli lepší přežití (37). Nemutovaný stav *IGHV* genů byl stanoven na základě alespoň 98% sekvenční homologie s odpovídajícím germinálním V subgenem (1% koresponduje s 3 nukleotidovými mutacemi v *IGHV* genu) (27, 37). Další práce srovnávaly celkové přežití pacientů a pravděpodobnost zahájení terapie v závislosti na stupni homologie *IGHV* s geny germinální linie (Obrázek 10 a 11) (106).



Obrázek 10: Křivka přežívání pacientů ve stádiu Binet A v závislosti na mutačním stavu *IGHV* (Kröber a kol, 2002) (106)



**Obrázek 11: Zastoupení léčených a neléčených pacientů (%) v závislosti na počtu mutací *IGHV* (%)** (Tobin a kol, 2005) (107)

Přes technickou a finanční náročnost vyšetření mutačního stavu *IGHV* zůstává jeho stanovení zcela zásadním markerem pro stanovení prognózy pacienta.

#### 5.2.4. ZAP-70 a CD38

Profil genové exprese DNA čipy nemocných s mutovaným a nemutovaným stavem *IGHV* ukázal rozdílnou expresi některých genů, z nichž jeden kóduje protein ZAP-70. Techniky stanovení mutačního stavu *IGHV* jsou nákladné. Z tohoto důvodu byly činěny snahy nalézt náhradní marker, např. měřit koncentraci intracelulárního proteinu ZAP-70 pomocí metody průtokové cytometrie.

Četné studie prokázaly asociaci zvýšení koncentrace ZAP-70 s rychlejší progresí choroby nebo kratším celkovým přežitím nemocných (108, 109). Kombinace znalosti exprese ZAP-70 a CD38 může zpřesnit prognózu pacienta a predikovat progresi onemocnění (110).

Problémem je ale standardizace metody, metoda je náročná technicky a její interpretace je navíc zatížena velkou individuální chybou. Flowcytometrické metody stanovení jsou různé, stanovuje se procento ZAP-70 pozitivních buněk k isotypové kontrole (ISO-metoda) nebo k ZAP-70 pozitivním T lymfocytům (T-metoda) nebo T/B poměr, T/B Ratio-metoda (111). Problémy při stanovení ZAP-70 jako nezávislého prognostického markeru vedly k tomu, že v roce 2010

NCCN již jeho stanovení nedoporučila. IWCLL guidelines doporučuje stanovení ZAP-70 jako prognostického markeru v rámci klinických studií (1, 112).

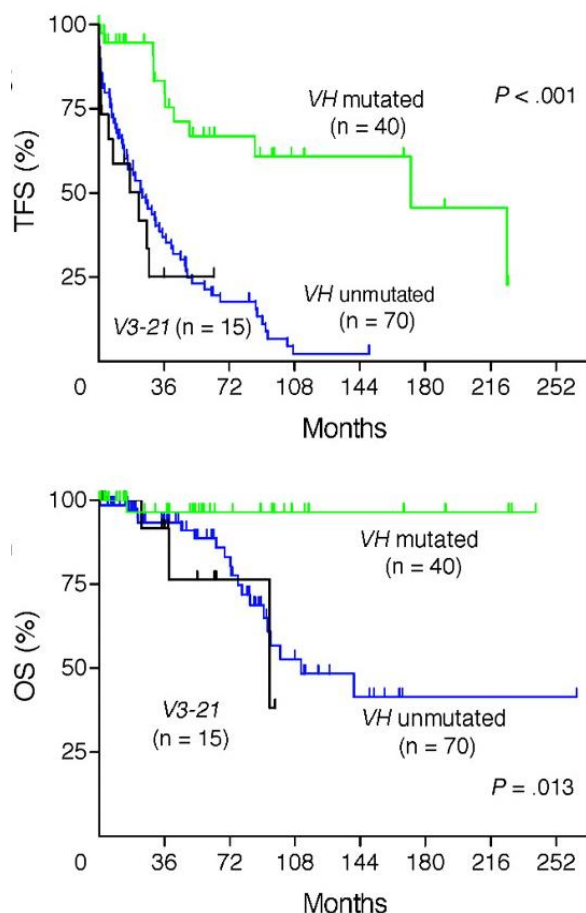
#### 5.2.5. Subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69*

Rozsah přestaveb imunoglobulinových genů v buňkách CLL je ve srovnání s normálními B-lymfocyty omezený, v důsledku čehož je zastoupení subgenů u zdravých a nemocných s CLL rozdílný. Nejčastěji se vyskytující subgeny u pacientů s CLL náleží do VH3, VH4 a VH1 rodiny (49, 113). Práce Johnsona a kolektivu z roku 1997 ukazuje na omezené použití repertoáru *IGHV* genů. Ze 117 pacientů 35 % bylo z VH1 rodiny genů, přitom 63 % z nich mělo použito subgen *IGHV1-69*, dále byly zastoupeny subgeny *IGHV1-2*, *IGHV1-3* a *IGHV1-8*. Další byly zastoupeny méně (114).

K somatickým hypermutacím nedochází v rámci různých V rodin uniformně. Pozorován byl zvýšený výskyt mutací ve VH3 rodině oproti VH1 rodině. Ve VH1 rodině nebývají somatické hypermutace přítomny (50). Omezení přestaveb imunoglobulinových genů dokazuje roli antigenní stimulace, která může vést k leukemogenezi (115, 116).

VH3 je nejčastěji se vyskytující rodina genů, kde pacienti mají rozdílný klinický průběh onemocnění. *IGHV3-21* a *IGHV3-23* subgeny jsou považovány za prognosticky nepříznivé, *IGHV3-72* a *IGHV3-30* za subgeny s indolentním průběhem onemocnění (117).

Výskyt subgeneru *IGHV3-21* je spojován s nepříznivou prognózou nezávisle na mutačním stavu. Nebyl prokázán rozdíl v intervalu do nutnosti zahájení léčby (TFS) a rozdíl v celkovém přežití (OS) pacientů se subgenem *IGHV3-21* a nemocných s nemutovaným stavem *IGHV* (Obrázek 12) (118). Přitom dvě třetiny pacientů s *IGHV3-21* mají *IGHV* řetězec mutovaný (48) (38).



**Obrázek 12: TFS a OS u pacientů s mutovaným a nemutovaným stavem *IGHV* a pacientů s *IGHV3-21*** (Kröber a kol, 2006) (118)

U *IGHV3-21* subgenu byla popisována vysoce heterogenní geografická distribuce. Ve skandinávských zemích se vyskytuje u více než 10 % pacientů s CLL, je užíván v mutované konfiguraci s malým počtem mutací *IGHV* (2–5 %) (48, 119). Vyšší četnost v zastoupení *IGHV3-21* subgenu je detekována také v Británii, Belgii, naopak v jižní Evropě nebo Francii je zastoupení *IGHV3-21* subgenu pod 5 % všech CLL pacientů. Recentní práce ale zpochybňují geografickou závislost frekvence výskytu *IGHV3-21* subgenu (120).

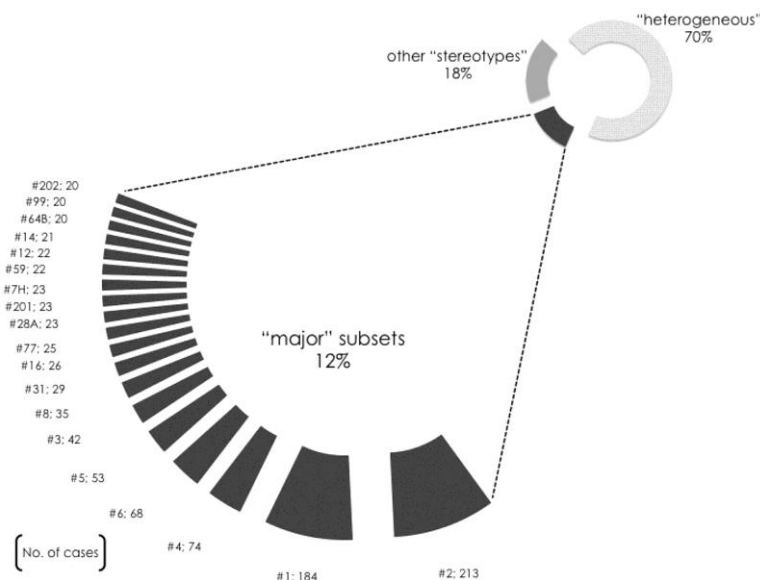
#### 5.2.6. Stereotypní BCR a subset #2

Jak již bylo zmíněno, existuje výjimka z pravidla, že pacienti s mutovaným stavem *IGHV* mají lepší prognózu než pacienti s nemutovaným stavem. Tou výjimkou jsou pacienti *IGHV3-21*. Ti, byť většinou s mutovaným stavem *IGHV*, mají špatnou prognózu bez ohledu na mutační stav. Je zajímavé, že přibližně polovina těchto pacientů má v podstatě totožnou krátkou sekvenci aminokyselin



variabilní oblasti těžkého řetězce CDR3 a identické lehké řetězce, jak popisuje ve své práci Tobin (38).

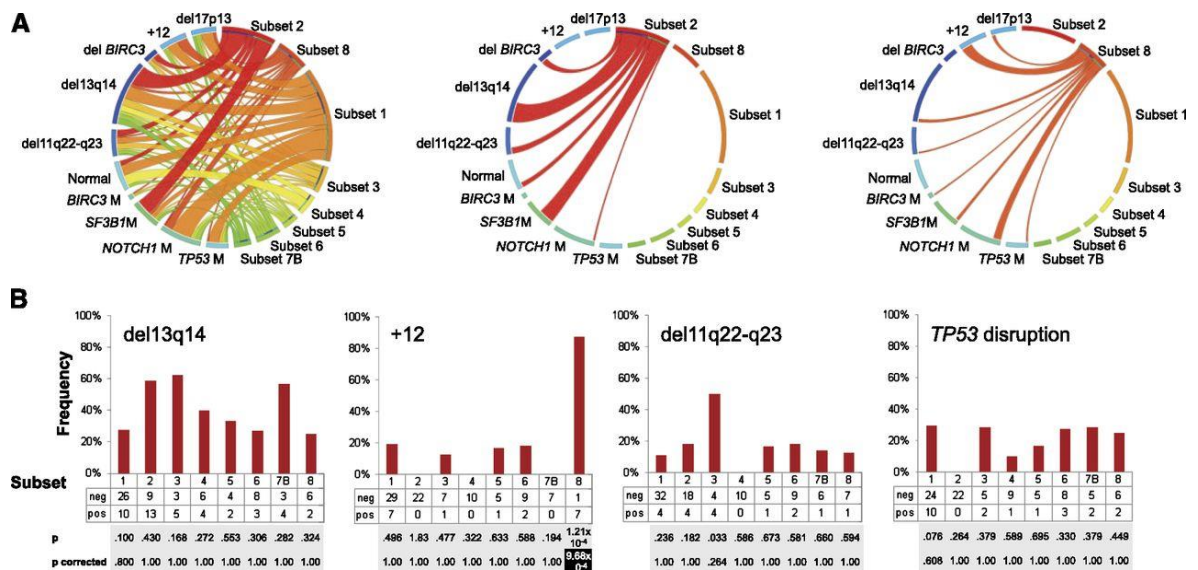
Na velkých skupinách pacientů byl studován a určen podíl pacientů se stereotypní VH CDR3, který čítal 20–28 % všech nemocných. Stomatopoulos v roce 2007 uvádí celkový výskyt stereotypních receptorů 20 % všech pacientů s CLL. Je důležité, že skupiny pacientů s danými stereotypními vzory mohou mít stejné biologické a klinické charakteristiky a případně stejné přežití (52). Objev stereotypních receptorů vedl k doporučení rozdělit pacienty s CLL do dvou podskupin podle přítomnosti stereotypních BCR (121). Otázka zněla, zda při studiu dostatečného počtu pacientů lze každý BCR zařadit do určité stereotypní skupiny. Práce studující téměř sedm a půl tisíce pacientů na tuto otázku odpověděla záporně, poměr stereotypních k nestereotypním BCR je 1:2 (Obrázek 13) (122).



**Obrázek 13: Rozdělení pacientů s CLL dle přítomnosti stereotypního receptoru, podmnožina stereotypních BCR včetně subset #2 (Agathangelidis a kol, 2012) (122)**

Cahill a kol. v roce 2010 publikoval práci, která u subgenu *IGHV3-21* s definovanou stereotypní vazbou sledovala výskyt genomických aberací metodou array CGH, byl prokázán vyšší výskyt delece 11q a delece 13q u pacientů s *IGHV3-21* oproti *IGHV4-34* a celému souboru pacientů (123).

U subgeneru *IGHV3-21* se stereotypní vazbou, dříve označovanou jako Skandinávský receptor, byl popsán kratší TFS, ale stejné OS ve srovnání s pacienty bez tohoto receptoru. Tato stereotypní vazba znamená agresivní průběh nemoci (124). V recentní literatuře je používána nová nomenklatura v rámci širší definice stereotypních receptorů, a to subset #2 (BCR krátká a jednotná CDR3 s celkem 9 aminokyselinami, lehkými řetězci IGLV3-21 a užitím IG  $\lambda$ , sled aminokyselin CDR3 je DANGMDV). U pacientů se stereotypním receptorem subset #2 bylo pozorováno vyšší zastoupení delece 11q a také kombinované změny delece 11q a delece 13q (119). Svoje výsledky na toto téma publikoval v roce 2013 Rossi a kolektiv. Výsledkem jejich studia je pozorování, že stereotypní receptor subset #2 sice nepředstavuje prognostický marker jako takový (zásadním zůstává nemutovaný stav *IGHV*), ale znamená dispozici k vývoji určitých genetických změn, specifických mutací a aberací, které ve finále spoluurčují prognózu pacienta. U subsetu #2 je popsán predilekční výskyt delece 11q, delece 13q, mutace *SF3B1* a naopak se zde nevyskytuje delece 17p a trisomie 12 (Obrázek 14) (125).



**Obrázek 14: Vztah stereotypních receptorů (subsetů) včetně subset #2 a rekurentních aberací a mutací (zejména delece 13q, delece 11q, *SF3B1* mutace a mutace nebo delece *BIRC3*) (Rossi a kol., 2013) (125)**

V roce 2006 referuje Panovska-Stavridis horší přežívání u pacientů s *IGHV1-69* subgenem, ne však horší než u pacientů s nemutovaným stavem *IGHV*. Pacienti měli pokročilejší stadia onemocnění a vyžadovali včasné zahájení léčby. *IGHV1-69* je téměř výhradně spojen s nemutovaným stavem *IGHV*, jedná se o uniformní skupinu pacientů. Četnější byl výskyt D3-3 a CDR 3 sekvence aminokyselin FWSGY. V práci je opět hledána spojitost mezi imunoglobulinovými geny a antigeny, byl pozorován zvýšený výskyt *IGHV1-69* u pacientů z malého geografického regionu (126).

Orlandi v roce 2009 referoval soubor 49 pacientů s *IGHV1-69*, v 87 % v nemutovaném stavu *IGHV* s častou stereotypní vazbou s D3-3, D2-2, častou vazbu D3-3 s J6, relativně dlouhým úsekem DR3, relativně častější výskytem subsetů DR3. Opět je uváděn krátký TFS, nelišící se od ostatních pacientů s nemutovaným stavem *IGHV*, častější je zastoupení pacientů v pokročilejších stádiích nemoci. Práce popisuje preferenční zastoupení mužů, častěji se vyskytovaly vysoce rizikové genetické změny delece 11q a delece 17p (127). Také Maurer v roce 2005 demonstroval trend ke kratšímu TFS u pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* a subgenem *IGHV1-69* při vazbě s D3-3 a J6 (128). Galligan v roce 2008 publikoval práci týkající se pacientů s *IGHV1-69* s mutovaným stavem *IGHV* a klinicky příznivým průběhem nemoci. Z 330 pacientů mělo 32 pacientů subgen *IGHV1-69* (9,7 %), celkem 7 pacientů mělo mutovaný stav *IGHV* a současně krátký a více divergentní CDR3. Tito pacienti neměli nepříznivé cytogenetické aberace a měli častější stádium onemocnění Binet A (129).

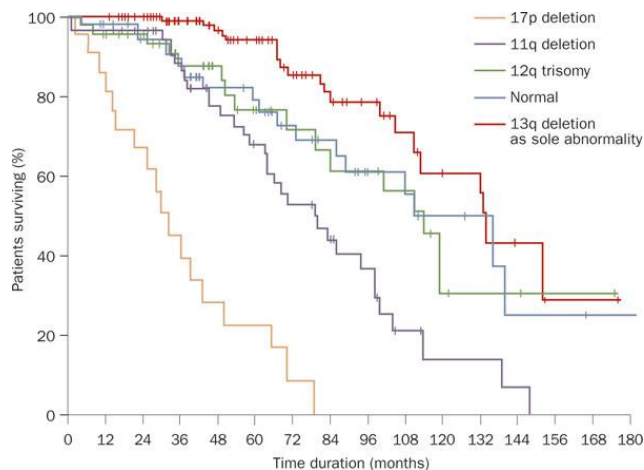
#### 5.2.7. Cytogenetika a molekulární cytogenetika

Genetika a molekulární cytogenetika přispěly významným způsobem k objasnění podstaty heterogenity onemocnění. Limitem konvenční cytogenetiky je chování leukemických buněk in vitro. Buňky mají nízkou schopnost přejít do metafáze. Až objev polyklonálních mitogenů B lymfocytů umožnil úspěšné cytogenetické analýzy.

V roce 1990 Juliusson použil konvenční karyotypování a systematicky vyhodnotil prevalenci a prognostický význam chromosomálních abnormalit spojených s CLL. Přes technické omezení metodiky bylo zjištěno, že polovina pacientů měla klonální chromosomové změny. U 19 % pacientů byla popsána

trisomie chromosomu 12, u 10 % pacientů změny na chromosomu 13, u 8 % pacientů změny chromosomu 14, 8 % pacientů mělo aberace na chromosomu 11, 6 % nemocných změny chromosomu 6 a 4 % případů změny na chromosomu 17 (130).

V roce 2000 publikoval klíčovou studii Döhner, kde představil dnes široce používaný hierarchický model genetických změn využívající FISH analýzy. Autorský kolektiv našel chromosomální abnormality u více než 80 % pacientů. Model rozděluje pacienty do pěti rizikových kategorií, kterým odpovídají rozdílné mediány OS (Obrázek 15). Výskyt delece 17p byl 7 %, delece 11q byla nalezena v 18 %, trisomie 12 v 16 %, normální karyotyp v 18 % případů a delece 13q v 55 % případů (47).



**Obrázek 15: Křivka OS pacientů v závislosti a genetických změnách, Döhnerův hierarchický model (Döhner a kol, 2000) (47)**

Rutinní zavedení FISH tak znamenalo zlepšení detekce chromosomových změn. Nevýhodou FISH a použití specifických sond je však omezený rozsah vyšetřovaných změn. Komparativní genomická hybridizace (CGH) detekuje změny v celé šíři genomu. Stilgenbauer a kolektiv přinesli výsledky německé skupiny pro CLL (GCLLSG), kdy dali do souvislosti deleci 11q s výraznou lymfadenomegalií a rychlou progresí onemocnění. Delece 17p pak predikovala selhání léčebného efektu alkylačních látek a fludarabinu a krátké OS. V multivariantní analýze delece 11q a 17p přinášely nezávislou prognostickou informaci. Studie porovnávala také mutační stav *IGHV* a genetické změny. Delece 13q byla častěji zastoupena u pacientů s mutovaným stavem *IGHV*,

naopak delece 11q a 17p byly častěji zastoupeny u nemutovaného stavu *IGHV*, a to ve všech případech statisticky významně, naopak u trisomie 12 nebyl popsán predilekční výskyt ve vztahu k mutačnímu stavu *IGHV*. Autoři doložili přetrvávající prognostický význam stanovení delece 11q a delece 17p i v době stanovování mutačního stavu *IGHV*. Uvedené genetické změny zhoršují dále prognózu i v případě přítomnosti nemutovaného stavu *IGHV* a to bez ohledu na klinické stádium onemocnění. Genomické aberace a mutační stav v časných klinických stádiích tak přinesly přesnější informaci o individuálním riziku onemocnění (131, 132).

#### 5.2.7.1. 13q14

Tato nejčastější chromosomová změna se vyskytuje u pacientů s CLL s výskytem zhruba v 50 % případů. Ve dvou třetinách případů se vyskytuje jako izolovaná aberace, u třetiny jedinců společně s aberací jinou. U části pacientů je nalézána jako bialelická delece nebo v kombinaci s delecí monoalelickou, u většiny pacientů však jako delece monoalelická. Samostatná monoalelická delece 13q14 znamená pro pacienta příznivější průběh onemocnění než u pacienta s normálním cytogenetickým nálezem. Častěji se delece 13q14 vyskytuje u případů s mutovaným stavem *IGHV*. Bialelická delece 13q14 pozitivní prognostický význam nemá (133). Je pravděpodobné, že se v oblasti 13q14 vyskytuje nádorový supresor. Delece zahrnuje oblast lokalizace genů *DLEU2*, *miRNA15a* a *miRNA16-1*. Zejména malé nekódující *mikro-RNA* jsou dnes intenzivně studovány a je analyzován jejich vliv na regulaci exprese proteinu Bcl-2, který hraje klíčovou antiapoptotickou roli (42).

#### 5.2.7.2. Trisomie 12

Jedná se o numerickou změnu s výskytem 15–20 % případů. U CLL byla identifikována jako první rekurentní aberace. Byla spojována s atypickou morfologií buněk, vyšším zastoupením prolymfocytů, silnou expresí povrchových imunoglobulinů (Smlg) a FMC7, pokročilejším onemocněním a s horší prognózou (134). Novější studie již tento význam nepotvrzují (131). Hledání kandidátních genů je taktéž zatím neúspěšné, studovány jsou *MDM-2*, *GLI1*, *HMGA2* (135).

### 5.2.7.3. Delece 11q22-q23

Podle výsledků FISH analýzy je delece části dlouhých ramen chromosomu 11 druhou nejčtenější abnormalitou u CLL. Döhner v roce 1997 vyšetřil 214 pacientů, delece 11q byla prokázána u 20 % z nich. Jednalo se o mladší pacienty s pokročilou chorobou, s uzlinovým „bulkem“ (na periférii nebo abdominálně), s krátkým TFS a s krátkým PFS. U nemocných s věkem pod 55 let s delecí 11q bylo zjištěno významně horší OS (ve studii 64 měsíců vs 209 měsíců), ve věku nad 55 let nebyl prokázán rozdíl v OS pacientů s delecí 11q a bez delece (94 vs 111 měsíců) (26).

Molekulárně genetickými metodami byl v oblasti 11q identifikován deletovaný úsek zahrnující regiony 11q22.3-11q23.1. V této oblasti byly studovány geny *RDX* a *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), které jsou označovány za klíčové tumor supresorové geny. Studium genové exprese potvrdilo deregulaci řady genů deletované oblasti 11q (135).

Delece 11q22-q23 byla historicky spojována s progredující formou CLL, špatnou léčebnou odpovědí na alkylační látky a fludarabin, pacienti měli významně zkrácené OS (136). Zavedení režimů chemoimunoterapie s rituximabem změnilo prognózu pacientů s touto genetickou abnormalitou. V GCLLSG CLL8 léčba FCR výrazně zlepšila kompletní odpovědi u pacientů s 11q22-q23 delecí v porovnání s FC (51 % vs 15 %,  $p < 0,000$ ) (137).

### 5.2.7.4. Delece 17p

Delece 17p se vykytuje v 7 % všech nově diagnostikovaných pacientů (47). Mutace *p53* u pacientů bez delece 17p má stejný prognostický význam (138, 139). Nejčastěji se tedy jedná o delecí jedné alely, která je provázána mutací druhé alely *p53* s následnou ztrátou funkce genu. Ztráta funkce genu *p53* vede k dalším změnám v genomu, což se odráží na klinickém obrazu onemocnění (132). Významně častěji je spojena s výskytem nemutovaného stavu *IGHV*, medián OS těchto pacientů je 3–4 let. Prognostický význam delece 17p zůstává zachován i v případě nemutovaného stavu *IGHV* (140).

Delece 17p představuje silný prediktor OS a refrakterity na léčbu, má také přímé důsledky pro vedení léčby. Pacienti dosahují při léčbě FCR pouze 5 % kompletních remisí ve srovnání s 50 % kompletních remisí u pacientů bez

delece 17p. Výsledkem je krátké přežití bez progresu (11,2 měsíců vs 51,8 měsíce u pacientů bez delece 17p) a krátké OS (38,1 % ve 3 letech) (137). Z toho vyplývá nutnost vyšetřovat pacienty opakovaně před každou linií léčby na přítomnost delece 17p, ale také na přítomnost mutace *p53*. V případě pacientů s chemorefrakterností má až 40 % pacientů *p53* mutaci, u zbývajících 60 % je molekulární podstata nejasná (141).

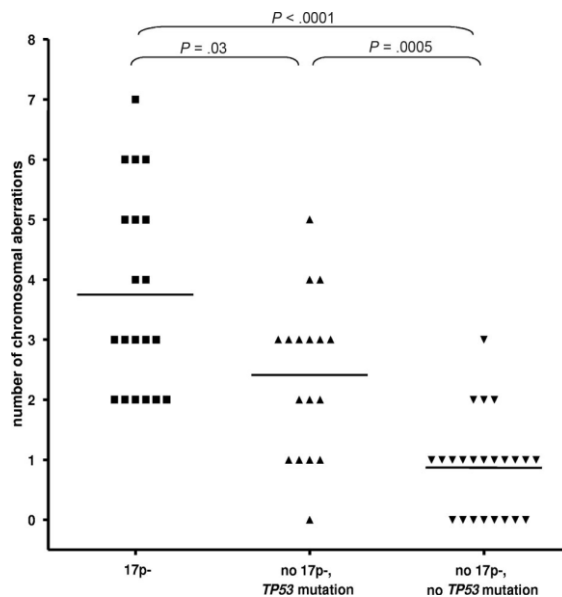
#### 5.2.8. Molekulární biologie

Samy cytogenetické léze nevysvětlují kompletně genetický základ klinické heterogenity CLL. Nové technologie sekvenování umožňují identifikovat jak nové mutace v oblasti genů *p53* a *ATM*, ale také další dosud neznámé mutace kandidátních genů. Mutace genů *NOTCH1*, *SF3B1* a *BIRC3* jsou spojeny s krátkou dobou do progresu onemocnění a krátkým OS. Každá z mutací se vyskytuje v různých klinických fázích choroby a biologicky odlišných podskupinách onemocnění. Výskyt určitého typu mutací může identifikovat pacienty, u nichž lze předpokládat rezistenci k podané terapii (45, 66, 67, 139, 142-144).

##### 5.2.8.1. Mutace v genu *p53*

Gen *p53* může být inaktivován delecí nebo somatickou mutací (47, 66, 67, 139, 142). Práce Zenta a kolektivu z roku 2008 přinesla detailní charakteristiky dlouhodobě sledovaných 126 pacientů, kteří měli provedeno vyšetření metodou denaturační vysokotlaké kapalinové chromatografie a přímým sekvenováním k detekci mutace *p53* (v exonech 2–11). U celkem 13 pacientů byla spolu s delecí 17p nalezena také mutace *p53*. Mutace bez delece 17p byla detekována u 5 pacientů, pouze delece 17p bez mutace *p53* byla identifikována u 3 pacientů. Bylo zjištěno 19 typů *p53* mutací. OS ve všech podskupinách bylo velmi krátké, a to jak u jedinců se současnou delecí 17p a mutací *p53*, tak i s izolovanou mutací *p53* a izolovanou delecí 17p (7,6 měsíce vs 5,5 měsíce vs 5,4 měsíce). Prognostický význam mutace *p53* v multivariantní analýze byl nezávislý na stádiu onemocnění, mutačním stavu *IGHV*, delecí 11q a delecí 17p. Nález dále ukázaly evidentní klonální evoluci a zvětšování velikosti klonu během chemoterapie u řady nemocných. Práce také prokázala signifikantní zvýšení

počtu genetických aberací u pacientů s delecí 17p a mutací *p53* bez delece oproti pacientům bez mutace *p53* a bez delece 17p (Obrázek 16) (139).



**Obrázek 16: Vyšší stupeň komplexních genetických změn u pacientů s delecí 17p oproti pacientům s mutací *p53*** (Zenz a kol., 2008) (139).

V souladu s genetickou nestabilitou DNA v případě inaktivace *p53* je tento stav spojen s častým výskytem komplexních cytogenetických abnormalit, zejména s nebalancovanými translokacemi (142).

Mutace *p53*, dokonce v nepřítomnosti delece 17p je prediktorem špatné odpovědi na léčbu a krátkého OS. Ve studii GCLLSG CLL4 (F vs FC) u žádného ze 74 pacientů s mutací *p53* nebylo dosaženo kompletní odpovědi, a medián PFS (23,3 vs 62,2 měsíce) a medián OS (29,2 vs 84,6 měsíce) byly významně kratší u pacientů s *p53* mutací než bez mutace (145).

#### 5.2.8.2. Mutace v genu *ATM*

Gen *ATM* je členem fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K) genové rodiny, kóduje nukleární serin, threonin kinázu, jejíž aktivita je indukována chromosomálními zlomy, které vznikají endogenně nebo po působení DNA-škodlivých látek, včetně ionizujícího záření a chemoterapeutik. *ATM* chrání integritu genomu tím, že reguluje buněčný cyklus zástavou v G1/ S a G2/ M tak, aby se zabránilo zpracování poškozené DNA. *ATM* dále aktivuje DNA reparační



dráhy či indukci apoptózy v případě, že DNA poškození nelze opravit. Mnohé z těchto účinků jsou zprostředkovány aktivací závislou na *p53*, jiné fungují nezávisle (146).

*ATM* je velký gen kódující 62 exonů, nachází se v oblasti 11q22-q23, která může být u CLL deletována. Je pravděpodobné, že i další tumor supresorové geny uvnitř 11q22-q23 regionu jsou zapojeny ve vývoji nemoci (45, 143, 146).

Prognostický dopad mutací v *ATM* u CLL byl zkoumán pouze v několika studiích vzhledem k náročnosti sekvenování tohoto velkého genu.

Pacienti nesoucí mutace *ATM* mají statisticky významně kratší OS (85 měsíců) a TFS (40 měsíců) ve srovnání s pacienty bez mutace *ATM* a *p53* (217 měsíců a 130 měsíců) (46, 144).

Studie LRF CLL4 u pacientů s oběma *ATM* mutacemi a 11q22-q23 delecí ukázala významně kratší PFS (medián 7,4 měsíce) ve srovnání s těmi s divokým typem *ATM* (28,6 měsíce), s 11q22-q23 delecí (17,1 měsíce), nebo *ATM* samostatnou mutací (30,8 měsíců). Medián OS s bialelickou mutací *ATM* byl zkrácen významně ve srovnání s divokým typem *ATM* nebo mutací *ATM* samostatně (42,2 vs 85,5 vs 77,6 měsíce). Proto v případě použití pouze chemoterapie, může být za částí chemorefrakternosti v případě pacientů bez aberace *p53* právě *ATM* mutace. (147). *ATM* mutace představuje samostatný marker špatné prognózy pacientů, kteří jsou léčeni pouze chemoterapeutickými režimy neobsahujícími rituximab. Přidání rituximabu k intenzivní kombinované chemoterapii (FCR) vede k lepšímu výsledku v léčbě CLL s 11q22-q23 delecí.

### 5.2.8.3. Mutace v genu *NOTCH1*

Gen *NOTCH1* kóduje trans-membránový protein, který funguje jako ligandem aktivovaný transkripční faktor a reguluje několik cílových genů, včetně *myc*, *p53* a molekuly NF- $\kappa$ B cesty. Cesty, které řídí buněčný metabolismus a progresi buněčného cyklu, jsou deregulované *NOTCH1* mutací. Tato mutace je nalézána mnohem častěji u CLL s nemutovaným *IGHV* stavem a trisomií chromosomu 12 (148-151).

Ve studii UK LRF CLL4 byl medián OS pacientů s mutací *NOTCH1* 55 měsíců (152). Dle GCLLSG CLL8 je mutace *NOTCH1* nezávislý prediktor krátkého PFS po FCR (137). Pacienti s *NOTCH1* nemají benefit z přidání

rituximabu do terapie. Dle studie CLL2H má *NOTCH1* mutace lepší PFS po alemtuzumabu ve srovnání s divokým typem *NOTCH1* (153).

Skandinávská studie nově diagnostikovaných pacientů prokázala asociaci *NOTCH1* s krátkým OS a TFS (154).

#### 5.2.8.4. Mutace v genu *SF3B1*

Tento gen je základní součástí komplexu pěti malých jaderných ribonukleoproteinů, které se podílí na sestřihu mRNA prekurzoru a při tvorbě zralé mRNA. *SF3B1* mutace u CLL jsou téměř vždy zastoupena jako missense, tj. měnící smysl kodonu.

Pacienti s *SF3B1* mutací mají signifikantně kratší TFS a kratší OS ve srovnání s divokým typem (v 10 letech 10–48 % vs 60–77 %) (155, 156).

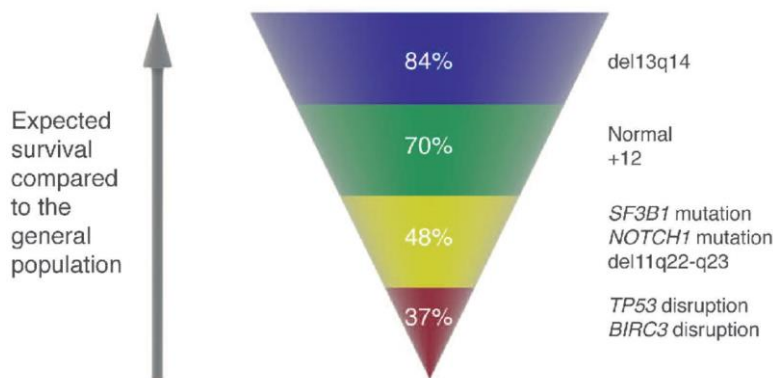
Ve studii UK LRF CLL4 je OS pacientů s mutací *SF3B1* 54 měsíců (152). Dle studie GCLLSG CLL8 je *SF3B1* nezávislý prediktor krátké doby do progresu onemocnění po FCR (137).

#### 5.2.8.5. Mutace v genu *BIRC3*

*BIRC3* gen je negativní regulátor MAP3K14 serin-treonine kinázy, která je stěžejním aktivátorem nekanonické NF- $\kappa$ B signalizace.

Pacienti s *BIRC3* mají krátký OS (roky stejně jako pacienti s p53) (157).

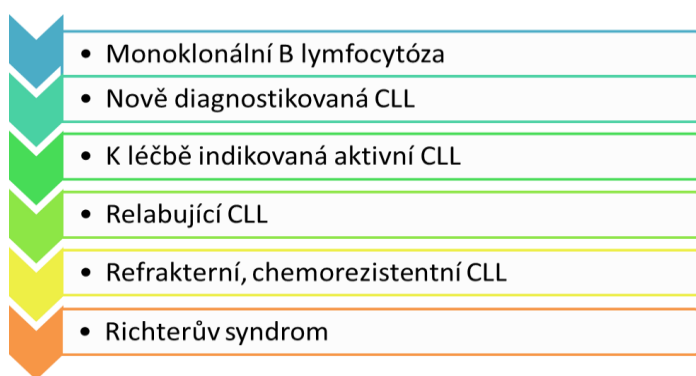
Nejsou zcela prozkoumány všechny korelace a anti-korelace mezi *NOTCH1*, *SF3B1* a *BIRC3* lézemi a dalšími nepříznivými genetickými abnormalitami. Klíčové studie naznačují, že *NOTCH1* a *SF3B1* mutace mají tendenci se vzájemně vylučovat mezi sebou a p53, což představuje alternativní genetické mechanismy vedoucí k rizikovosti choroby (148, 149, 155, 156, 158). OS pacientů při integraci mutací do cytogenetického modelu ve srovnání s běžnou populací ukazuje obrázek (Obrázek 17) (159).



**Obrázek 17: Přežití pacientů při integraci mutací do cytogenetického modelu ve srovnání s běžnou populací (Foà a kol, 2013) (159)**

### 5.3. Molekulární genetik a vývoj onemocnění

V současnosti je na CLL nahlíženo jako na onemocnění vícefázové. Od pre-maligního stavu tzv. monoklonální B lymfocytózy, nově diagnostikované choroby, aktivní choroby vyžadující léčbu až po chorobu relabující, chemorezistentní, případně až po stádium možné transformace nemoci do agresivního lymfomu v podobě Richterova syndromu (Obrázek 18).



**Obrázek 18: CLL jako vícefázové onemocnění**

Díky novým molekulárně genetickým informacím získaným sofistikovanými metodami sekvenování jsou objevovány nové klinické souvislosti ve vývoji onemocnění (159).

V poslední době byl studován výskyt rekurentních genetických změn právě v závislosti na jednotlivých fázích nemoci. Delece 13q14 a 12 trisomie byly obdobně zastoupeny ve všech fázích nemoci. Toto zjištění je v souladu s představou, že 13q14 delece a trisomie chromosomu 12 představují časově

první změny při vývoji onemocnění. Všechny ostatní změny se hromadí až v pokročilejších fázích, což naznačuje, že reprezentují časově následný impulz v průběhu evoluce klonu. Již ve fázi MBL jsou nalezeny genetické léze, které bývají zjištěny u rozvinuté CLL. 13q14 delece je zjištěna u MBL ve 40–50 % případů podobně jako u CLL. MBL od CLL naopak odlišuje výrazně nižší výskyt (0–3 %) sekundárních změn, které jsou spojovány s rizikovostí nemoci, tj. 11q22-q23 delece, 17p delece a mutace *p53*, *NOTCH1*, *SF3B1* a *BIRC3* (4, 160, 161). Výskyt delece 17p je u nově diagnostikované CLL nalézán u 5 %, u progredující CLL při první léčbě v 8–11 % případů a u 30 % v relapsu a u fludarabin-refrakterních pacientů. Výskyt mutace genu *p53* je 5–10 % u nově diagnostikovaných CLL, v 10 % u progredující CLL vyžadující první léčbu, u 40 % případů v relapsu a fludarabin-refrakterní CLL (141, 145, 162). Kombinace mutace a delece genu *p53* se vyskytuje u 10 % nově diagnostikovaných CLL, více než v 15 % u progredující CLL vyžadující první léčbu a ve 45 % u relapsu a fludarabin-refrakterní CLL. Jedná se tak o nejčastější léze u vysoce rizikové klinické podjednotky refrakterních a relabujících nemocných (66, 139).

Delece 11q22-q23 se vyskytuje v méně než 10 % nově diagnostikovaných CLL, její prevalence stoupá na 20 % v době první léčby, respektive na 20 % v době refrakterity na fludarabin (136, 153). *ATM* mutace byly prokázány v 10–15 % nově diagnostikovaných pacientů, v 15 % u progredující CLL vyžadující první léčbu. V případě spojení mutace a delece je výskyt 20 % u nově diagnostických CLL, v 35 % případů vyžadujících první léčbu (46, 144, 147).

V případě mutací *NOTCH1*, *SF3B1* a *BIRC3* je situace analogická, s vývojem onemocnění narůstá jejich výskyt (148, 149, 156, 158).

*ATM*, *BIRC3* a *SF3B1* jsou časté u chemorefrakterního relapsu a naopak nízký je výskyt u Richterova syndromu, což ukazuje na odlišnost patogenetických cest (155, 161).

#### 5.4. Klonální vývoj onemocnění

U značné části pacientů může dojít ke klonálnímu vývoji onemocnění. Porovnání profilu cytogenetických lézí z doby diagnózy a v době relapsu odhalilo rozdíly až u 20–40 % případů, což ukazuje na dynamický charakter klonální evoluce. Riziko vzniku nové genetické léze se zvyšuje s délkou trvání

nemoci, nemutovaným stavem *IGHV* a selekčním tlakem podávané léčby. Z klinického hlediska je klonální evoluce spojena se špatnými výsledky léčby, rezistencí na chemoterapii a možnou transformací onemocnění. Během klonální evoluce dochází především v rozvoji delece 17p nebo delece 11q (163, 164). Mutační analýzou bylo zjištěno, že vývoj nových mutací *p53* také přispívá ke klonální evoluci, a to zejména u chemorefrakterních pacientů a u pacientů s vývojem Richterova syndromu (161). V souladu s tímto pozorováním je aktuálně doporučeno opakovaně testovat mutace *p53* (165). Také mutace *NOTCH1*, *SF3B1* a *BIRC3* se mohou objevit v průběhu klonální evoluce (166). Otázkou zůstává, zda detekované mutace jsou přítomny v dřívějších fázích nemoci na subklonální úrovni nebo zda jsou získány de novo v průběhu onemocnění a zda přítomnost malých subklonů nesoucích rizikové genetické poškození od časných stadií nemoci může ovlivnit OS pacientů. Nejasnosti ve vývoji mutací by měly objasnit studie s novými citlivými technikami molekulární biologie studující jednotlivé fáze onemocnění. V zájmu optimalizace léčby a včasného odhadu chemorefrakterity CLL je velmi důležité vyšetřit molekulární původ vývoje onemocnění.

### 5.5. Richterův syndrom

Richterův syndrom (RS) znamená vývoj CLL do vysoce agresivního non-Hodgkinského lymfomu, prolymfocytární leukémie, Hodgkinova lymfomu nebo akutní leukémie. Poprvé byla popsána Mauricem Richterem jako rychlá fatální generalizovaná lymfadenopatie a hepatosplenomegalie u pacientů s CLL (167). Výskyt je uváděn různými autory různě, 2–8 % (168). Vyšší je incidence u pacientů léčených fludarabinovým režimem (169).

V klinickém obraze dominuje rychlé zhoršení celkového stavu, elevace laktát dehydrogenázy (LDH), horečky bez známek infekce a rychle progredující zvětšení uzlin. Prognóza je špatná, medián OS nemocných je 6 měsíců. Proto je nezbytná rychlá histologická diagnostika a u mladších pacientů reagujících na kombinovanou imunochemoterapii je efektivní léčebnou volbou alogenní transplantace krvetvorných buněk (168, 170, 171). U nemocných s RS se kombinují vlivy chemorezistence a rychlé progresse nemoci. Genetika RS výrazně ovlivňuje klinické chování. Běžně je pozorována vysoká míra *p53*

abnormalit (60 % případů) a chemorezistence (161). Dalšími nejčastějšími změnami u RS je mutace *NOTCH1* a aktivace *c-Myc*, které se vyskytují v 30 % případů RS. *c-Myc* dráha je pravděpodobně finální společná cesta tumorogeneze u RS (60 %) (148).

### 5.6. Prognostické indexy

První práce definující komplexní prognostický index u CLL byla publikována v roce 2007. Index byl vypracován na základě výsledků analýzy klinických a rutinních laboratorních vyšetření autory z MD Anderson Cancer center. Do studie bylo zařazeno 1674 pacientů mladších 65 let, kteří byli diagnostikováni v průběhu let 1981–2004. Index byl sestaven na základě znalosti tradičních prognostických znaků a hodnot B2M. Ve vícerozměrné analýze vyšly jako nezávislé prediktory prognózy: věk, B2M, absolutní počet lymfocytů, pohlaví, stádium dle Rai a počet skupin postižených lymfatických uzlin (Tabulka 3). Výsledkem analýzy byl funkční prognostický index, který odhaduje pravděpodobnost OS v 5 a 10 letech (100).

O dva roky později autoři z Mayo Clinic potvrdili prognostický význam výše uvedeného indexu na souboru 440 pacientů (172). Navíc studie prokázala, že si index zachovává výpovědní hodnotu i pro pacienty ve stádiu Rai 0 a současně rozptýlila obavy o platnosti indexu pro jakoukoliv skupinu pacientů.

Zajímavá studie byla referována v roce 2011 a následně v roce 2014 publikována skupinou německých autorů. Práce shrnuje současné poznatky o prognostických faktorech z CLL studií (CLL1, CCL4 a CCL8) ve vztahu k OS nemocných (93). Na základě Coxovy regrese byly identifikovány významné prediktivní faktory (delece 17p, sTk, B2M, nemutovaný stav *IGHV*, ECOG PS, delece 11q, mužské pohlaví a věk nad 60 let) a jednotlivým faktorům bylo přiřazeno určité bodové ohodnocení. Součtem bodů vzniklo prognostické skóre odhadující pravděpodobné OS.

**Tabulka 3: Bodové hodnocení jednotlivých prognostických faktorů pro sestavení prognostického indexu (Wierda a kol. 2007) (100)**

	Body			
	0	1	2	3
Věk	—	< 50	50–65	> 65
B2M	< horní hranice normy	1-2×horní hranice normy	> 2×horní hranice normy	—
Počet lymfocytů (×10 <sup>9</sup> /l)	< 20	20–50	> 50	—
Pohlaví	Žena	Muž	—	—
Stádium (Rai)	0–II	III–IV	—	—
Počet skupin postižených uzlin	≤ 2	3	—	—

V roce 2011 Wierda a kolektiv publikovali nový model pro odhad pravděpodobnosti zahájení léčby ve 2 a 4 letech. Do studie bylo zařazeno 930 pacientů, 36 % pacientů bylo ve stádiu Rai 0, medián věku zařazených pacientů byl 59 let (Tabulka 4) (101). Validaci tohoto modelu provedla skupina italských autorů v roce 2013 (173).

**Tabulka 4: Výchozí výsledky statistické analýzy pro výpočet prognostického indexu, (upraveno dle Wierda a kol., 2011) (101)**

	Index rizika (Hazard Ratio)	P
<i>IGHV</i> nemutovaný	10,68	< 0,001
Velikost největší palpované krční uzliny	1,32	< 0,001
FISH delece 11q	1,86	0,001
FISH delece 17p	2,12	0,01
Počet postižených uzlinových lokalit (3 v < 3)	1,64	0,004
LDH při mutovaném stavu <i>IGHV</i>	2,36	0,002
LDH při nemutovaném stavu <i>IGHV</i>	1,07	0,14

Bulian a kolektiv v roce 2012 publikovali další práci, která definovala nový klinicko-biologický prognostický index, kde třemi body bylo hodnoceno stádium nemoci Binet C, dvěma body stádium Binet B nebo věk > 65 let, jeden bod byl přidělen za mužské pohlaví, vyšší hodnoty B2M, nemutovaný stav *IGHV* a delecii 17p. Pacienti pak byli dle počtu dosažených bodů děleni do tří rizikových kategorií, nízké, střední a vysoké riziko s odhadem 5letého OS (102).

## 5.7. Stupeň dosažení léčebné odpovědi

### 5.7.1. Minimální reziduální choroba (MRD)

V éře moderní kombinované chemoimunoterapie s použitím monoklonálních protilátek se stupeň dosažení léčebné odpovědi (míra redukce nádorové populace) stává významným prognostickým faktorem.

V roce 2012 Böttcher s kolegy publikovali výsledky sledování MRD ve studii GCLLSG CLL8. Pomocí průtokové cytometrie (4-barevná průtoková cytometrie) byla vyšetřována MRD po 3 a 6 cyklech FC nebo FCR a následně pak s odstupem dvou měsíců po ukončení léčby. Pacienti byli podle stupně dosažení MRD rozděleni na tři prognostické skupiny (počet reziduálních buněk – MRD >  $10^{-2}$ , MRD <  $10^{-2}$  až >  $10^{-4}$  a MRD <  $10^{-4}$ ). Počet nemocných s MRD <  $10^{-4}$  byl ve skupině pacientů léčených FCR 63 %, ve skupině léčených FC 35 %. Pokud byla srovnávána skupina pacientů, kteří dosáhli MRD <  $10^{-4}$  se skupinou pacientů, kteří dosáhli odpovědi MRD >  $10^{-2}$ , potom byl nalezen statisticky významný rozdíl v OS i PFS ( $p < 0,0001$  a HR pro PFS je 21,8 a pro OS 7,1) s lepším OS pacientů s MRD <  $10^{-4}$ . Zajímavé je srovnání této míry prognostického rizika s prognostickým významem delece 17p (HR pro PFS je 3,6 a pro OS je 3,1) a prognostickým významem nemutovaného stavu *IGHV* (HR pro PFS 2,2). Pokud byl porovnáván význam stanovené MRD v periferní krvi nebo v kostní dřeni, pak oba kompartmenty nezávisle předpovídají PFS. Podobné pozorování bylo provedeno také ve studii CLL2M (rituximab a bendamustin), která také potvrdila význam stanovení MRD, kdy nízká úroveň MRD predikovala významně delší PFS. Prognostický význam stanovení MRD je nezávislý na dosažení klinické odpovědi (CR nebo PR). Největší význam má stanovení MRD po 2 měsících od ukončení léčby. Aktuálním cílem odborníků



špičkových evropských flowcytometrických center EuroFlow je vypracovat jednotnou, přesnou metodiku stanovení MRD. Skupina EuroFlow v současné době vyvíjí plně standardizované 8- barevné techniky stanovování MRD s citlivostí na hladině  $10^{-5}$  (174).

#### 5.7.2. Refrakterita k léčbě a refrakterita k léčbě fludarabinem

V klinické praxi se ukázalo, že významnou prognostickou podskupinu tvoří pacienti, kteří jsou refrakterní na fludarabin. Kritéria fludarabin-refrakterní choroby však nejsou zcela striktní, protože definice byla vždy závislá na konkrétním typu neúspěšné léčby. Používání chemoimunoterapie FCR změnilo také definici refrakterní choroby.

IWCLL 2008 definuje refrakterní CLL jako nedosažení CR/PR nebo relaps do 6 měsíců od ukončení léčby (1). Tato definice koresponduje s obdobím léčby chlorambucilem nebo fludarabinem v monoterapii. Se zavedením intenzivní léčby v první linii se podíl refrakterních pacientů pochopitelně snižuje. Vymezuje se tak skupina pacientů, kteří nejsou refrakterní dle tradiční definice, ale mají suboptimální odpověď nebo odpověď krátce trvající (24–36 měsíců) po intenzivní terapii. Refrakterní CLL je pak skupina pacientů s velmi špatnou prognózou, medián OS v mnoha studiích je 1–2 roky. Stilgenbauer a Zenz v roce 2010 definovali „ultra-high risk“ pacienty jako ty, kteří nereagují na fludarabin nebo podobné léky (např. bendamustin), časně (po 24 měsících) relabují po FCR nebo podobné léčbě s nutností zahájení nové terapie a pacienty s delecí 17p nebo mutací *p53* s indikací k léčbě (175).

EBMT doporučení z roku 2007 označilo vysoce rizikovou chorobu „high-risk“ jako onemocnění, u kterého je třeba zvažovat alogenní transplantaci krevetvorných buněk. V tomto pojetí znamená „high-risk“ choroba nedosažení léčebné odpovědi nebo časný relaps (do 12 měsíců) po léčbě fludarabinem, relaps po 24 měsících po dosažení odpovědi režimem s purinovými analogy nebo po autologní transplantaci. Do této skupiny patří také pacienti s *p53* vyžadující léčbu (176).

## 5.8. Prognostický přínos CT vyšetření

Význam CT vyšetření před zahájením léčby byl hodnocen na základě výsledků studie CLL4, CLL5 a CLL8. Celkem bylo v práci Eichhorstové a jejích kolegů hodnoceno 1372 pacientů v primoléčbě, z nich 481 po léčbě progredovalo, u 372 pacientů (77 %) byla progrese diagnostikována na základě fyzikálního vyšetření a změn v krevním obraze. Progrese byla stanovena pouze na základě CT u 44 pacientů (9 %), sonograficky u 29 pacientů (6 %). Celkem tedy u 15 % pacientů byl relaps diagnostikován na základě zobrazovacích vyšetření. Léčbu vyžadovalo 176 pacientů, léčba pouze na základě zobrazovacích metod byla indikována u 2 pacientů, tj. u 1 % pacientů.

Z uvedené studie vyplývá (ve srovnání s pacienty s NHL) mnohem menší význam CT vyšetření pro zahájení léčby relapsu CLL (177).

Pro hodnocení léčebné odpovědi je CT doporučeno pouze v případě, že je vstupně pozitivní a je pravděpodobnost dosažení kompletní remise onemocnění (1). Otázkou je přínos vyšetření CT před zahájením léčby k detekci nádorového „bulku“. Dle studie CLL4, CLL5 a CLL8 byla „bulky“ choroba na CT nebo ultrazvukovém vyšetření diagnostikována u celkem 233 pacientů, tj. u 17 %. Přitom nebyl nalezen vyšší počet léčebných odpovědí (ORR) u pacientů bez „bulky“ choroby, ale byl zjištěn vyšší počet dosažených CR. OS a PFS mezi oběma skupinami nebylo odlišné. PFS pacientů s bulky, kteří dosáhli CR verifikovanou CT vyšetřením proti PFS pacientů s CR verifikovanou pouze fyzikálním vyšetřením a trepanobiopsií byl ve všech studiích významně delší, ale tento fakt neplatil ve skupině pacientů léčených moderní imunochemoterapií FCR (177).

## 6. Léčba a léčebná odpověď

Vzhledem k tomu, že tématem práce je analýza prognostických faktorů, problematika indikace, možností léčby včetně možností nových, její výsledky a hodnocení léčebné odpovědi byly pouze přehledně shrnuty. Pro indikaci léčby CLL platí kritéria NCI-WG (1). Nemocní s pokročilým onemocněním (stádium C dle Bineta) jsou indikováni k zahájení léčby, u ostatních pacientů je léčba indikována při aktivitě CLL. Sama přítomnost nepříznivých prognostických faktorů (např. nemutovaný stav *IGHV* nebo delece 17p) není důvodem k zahájení léčby.

Aktivní choroba je definována jako:

1. Progresivní selhání funkce kostní dřeně, rozvoj nebo progresse anémie a/nebo trombocytopenie
2. Zvětšující se (více než 6 cm pod levým žeberním obloukem) nebo symptomatická splenomegalie
3. Lymfadenopatie (více než 10 cm) nebo progresivní nebo symptomatická lymfadenopatie
4. LDT kratší než 6 měsíců při vyloučení podílu infekce na progredující lymfocytóze
5. Autoimunitní anémie a/nebo trombocytopenie bez odpovědi na terapii kortikosteroidy nebo jinou léčbu
6. Jeden systémový příznak (váhový úbytek, významná únava, horečky bez prokázaného infekčního zdroje, noční pocení)

V ČR bylo v březnu 2013 vydáno Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukémie ČSCLL (178). Limitujícím faktorem intenzivní léčby je věk pacienta, přičemž je třeba zdůraznit, že je limitující věk biologický spíše než věk kalendářní. Moderní biologická léčba je tolerovatelná i staršími a komorbidními pacienty, jak dokazuje celá řada studií (179).

Před zahájením léčby pro aktivní chorobu je u pacientů, u kterých předpokládáme intenzivní léčbu, indikováno došetření prognostických faktorů: rekurentních cytogenetických aberací FISH (delece 13q, 11q, 17p, trisomie 12), stanovení mutačního stavu *IGHV*, vyšetření mutací *p53*, došetření exprese CD38 a ZAP-70, případně jsou došetřovány další rizikové mutace *NOTCH1*, *SF3B1* a *BIRC3* a to nejen před léčbou první linie, ale i před každou další linií

léčby (165, 166, 180). Přehled požadovaných a doporučených vyšetření před zahájením léčby s ohledem na to, zda je léčba vedena v klinické studii či nikoliv uvádí tabulka (Tabulka 5) (1)

**Tabulka 5: Požadovaná a doporučená vyšetření před zahájením léčby CLL (1)**

Požadovaná vyšetření před zahájením léčby	klinická praxe	klinické studie
Anamnéza, fyzik. vyš., stanovení PS	Vždy	Vždy
KO+díř	Vždy	Vždy
SP, trepanobiopsie	Vhodné	Vhodné
Biochemické vyšetření, hladiny Ig, imunohematologické vyšetření	Vždy	Vždy
RTG s+p	Vždy	Vždy
Infekční onemocnění (HIV, CMV, VHB, VHC)	Vždy	Vždy
FISH 13q-,11q-,17p-, trisomie12, 6q-	vhodné u léčby s cílem CR	Vždy
Mutační stav <i>IGHV</i> , <i>ZAP70</i> , <i>CD38</i>	vhodné u léčby s cílem CR	Vždy
CT hrudníku, břicha, pánve	vhodné u léčby s cílem CR	Vždy
MRI, PET CT	Ne	Ne
Ultrazvukové vyšetření břicha	Vhodné	Ne

Léčebná odpověď je posuzována po 2–3 měsících od ukončení léčby na základě fyzikálního vyšetření, vyšetření krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem. Na zvážení je vyšetření biopsie kostní dřeně (v případě léčby s cílem dosažení CR) a vyšetření zobrazovacími metodami, v případě iniciálního postižení (Tabulka 6).

**Tabulka 6: Hodnocení léčebné odpovědi** (upraveno dle Hallek a kol. 2008) (1)

Parametr	Kompletní remise (CR)	Parciální remise (PR)	Progresivní choroba (PD)
Skupina A			
Lymfadenopatie	Žádná nad 1,5 cm	Snížení o $\geq 50\%$	Zvýšení o $\geq 50\%$
Hepatomegalie	Není	Snížení o $\geq 50\%$	Zvýšení o $\geq 50\%$
Splenomegalie	Není	Snížení o $\geq 50\%$	Zvýšení o $\geq 50\%$
ALC	$< 4 \times 10^9/l$	Snížení o $\geq 50\%$	Zvýšení o $\geq 50\%$
Kostní dřeň	Normocelulární < 30 % lymfocytů Bez B lymfocytárních infiltrátů	Snížení infiltrace dřeně o $\geq 50\%$ nebo B lymfocytární infiltráty	
Skupina B			
Počet destiček	$> 100 \times 10^9/l$	$> 100 \times 10^9/l$ nebo zvýšení o $\geq 50\%*$	Snížení o $\geq 50\%$
Hemoglobin	$> 110\text{ g/l}$	$> 110\text{ g/l}$ nebo zvýšení o $\geq 50\%*$	Snížení o $\geq 20\text{ g/l}\%$
ANC	$> 1,5 \times 10^9/l$	$> 1,5 \times 10^9/l$ nebo zlepšení o $\geq 50\%$	

Citlivým vyšetřením, které predikuje efekt léčby, resp. interval do další progrese onemocnění, je stanovení MRD (na hladině  $10^{-4}$ ) flowcytometrickou analýzou dle doporučení Euroflow (174). Tato náročná a nákladná metoda je určena pro skupinu mladších pacientů léčených s cílem dosažení CR.

Terapie první linie vychází z výsledků randomizované studie CLL8. Za standard léčby pacientů bez závažných komorbidit je považována chemoimunoterapie FCR. U nemocných komorbidních je terapeutickou možností léčba chlorambucilem. U pacientů, kteří nejsou vhodní pro léčbu režimem FCR, je možno použít bendamustin v monoterapii, bendamustin v kombinaci s rituximabem nebo fludarabin a cyklofosfamid v redukováných dávkách v kombinaci s rituximabem (nízcedávkovaný FCR) (179, 181).

Specifickou skupinu tvoří pacienti se známkami autoimunitní hemolytické anémie, kteří jsou indikováni nejčastěji k léčbě rituximab, cyklofosfamid, vinkristin a prednison (R COP) nebo rituximab, cyklofosfamid a dexamethazon (RCD) (182). Taktéž pacienti s významnou renální insuficiencí nemohou být indikováni k režimu s fludarabinem (180). Léčebnou alternativou u nemocných, u kterých není možno použít fludarabinové režimy, je alemtuzumab (1). Další

indikací léčby alemtuzumabem je přítomnost delece 17p a mutace *p53*, kde je léčba fludarabinem neefektivní. Rituximab v monoterapii lze využít u pacientů s masivní infiltrací kostní dřeně a u autoimunitních cytopenií nereagující na první linii imunosupresivní léčby (183).

Léčba relapsu a refrakterní choroby je problematikou trvale aktuální, protože k relapsu dospěje většina pacientů s CLL. Léčba je vedena individuálně, některá doporučení však platí obecně. Původní léčbu lze opakovat, pokud léčebná odpověď trvala 12 měsíců a více (u kombinovaných fludarabinových režimů minimálně 24 měsíců). Základní možností léčby relapsu CLL je dle studie REACH režim FCR. V případě refrakterní choroby je vždy nutné změnit léčebný přístup. S ohledem na věk a kondici pacienta by měla být u vhodných pacientů zvažena alogenní transplantace krvetvorných buněk.

Alemtuzumab je možností léčby u nemocných, u kterých selhal fludarabinový režim (184). U nemocných s refrakterní CLL, refrakterní na fludarabin i alemtuzumab je lékem volby ofatumumab (185).

Dalšími možnostmi léčby relapsu a refrakterní CLL jsou vysokodávkované kortikoidy v monoterapii či kombinaci s dalšími léky (186, 187). Bendamustin v kombinaci s rituximabem je možné použít i u nemocných refrakterních na fludarabin (188). Rituximab v monoterapii lze indikovat u nemocných, kteří mají masivní postižení dřeně nebo kvůli komorbiditám nemohou absolvovat chemoterapii nebo u nemocných s autoimunitní cytopenií nereagující na první linii léčby. Kombinace rituximabu s chemoterapií (R COP, R CHOP) je možno využít u nemocných, kteří nemohou být léčeni fludarabinovými režimy (183). Intenzivní režimy (např. R DHAP – rituximab, dexamethazon, cytosinarabinosid, cisplatina) jsou indikovány u refrakterních nemocných mladšího věku v dobrém stavu (189).

Shrnutí léčebných možností přináší tabulka (tabulka 7).

**Tabulka 7: Léčebné možnosti** (upraveno dle Smolej a kol. 2013)

	Stav pacienta	Hlavní možnost	Léčebná alternativa
1. linie	Dobry klinický stav	FCR	Alemtuzumab
			R + vysocedávkované steroidy
			R + chemoterapie
1. linie	Významné komorbidity	Chlorambucil	Bendamustin
			FCR nízcédávkovaný
			Alemtuzumab
			R+chemoterapie
Relaps >12 měsíců		opakování původní terapie	
Refrakterní CLL	Dobry klinický stav	Alemtuzumab	R bendamustin
		Ofatumumab	R CHOP
		R+ vysocedávkované kortikoidy	R DHAP
		alogenní transplantace	
	Významné komorbidity	Alemtuzumab	R bendamustin
		Ofatumumab	FCR nízcédávkovaný
			R+chemoterapie

V denní praxi předléčených pacientů, u starších či komorbidních nemocných s CLL používáme režim nízcédávkovaný FCR (179).

Alogenní transplantace krvinek je indikována u pacientů v dobrém klinickém stavu s nepříznivým klinickým průběhem, refrakterní chorobou nebo u nemocných s trváním léčebné odpovědi po předchozí terapii <12 měsíců. V současnosti je v praxi upřednostňována alogenní transplantace po nemyeloablativní přípravě (190). Autologní transplantace periferních kmenových buněk se již standardně neprovádí (191).

Léčba CLL dozná v blízkém časovém horizontu podstatnou změnu. Je několik nových, nadějných léků, které byly pro léčbu CLL schváleny nebo procházejí pokročilou fází klinického vývoje a na schválení čekají.

Zcela zásadní roli ve stimulaci maligní buňky k přežití hraje buněčný receptor BCR a jeho signalizace buňce přes aktivaci tyrosinových kináz, Brutonovu tyrosin kinázu (BTK) a fosfatidyl inositol 3-kinázu (PI3K) až k aktivaci transkripčních faktorů (např. NF-κB). O významu BCR signalizace

svědčí skutečnost, že určité znaky BCR jsou uznány jako nezávislé prognostické faktory (např. mutační stav *IGHV*) a jiné znaky jsou ve vztahu k prognóze intenzivně studovány (stereotypní receptory). Mezi nové léky patří zejména specifické inhibitory tyrosinových kináz (inhibitor BTK – Ibrutinib a inhibitor PI3K – Idelalisib) a dále Bcl2 antagonisté (např. ABT199) a také nová anti CD20 protilátka (Obinutuzumab). Nesmírně cenná bude znalost individuální prognózy nemocných se zřetelem na stanovení mutací *NOTCH1*, *p53*, *ATM* a *SF3B1*. Individualizovaná léčba bude náročná také na výběr optimální varianty. Předmětem dalšího studia bude integrace nových léků s těmi dosud v terapii CLL používanými. Hallek v roce 2013 vidí koncept budoucí léčby CLL ve třech za sebou jdoucích krocích. Prvním krokem je v úvodu léčby „debulking“ tumoru s využitím klasické chemoterapie, jak ji známe a dosud používáme (použití fludarabinu, bendamustinu). Druhým krokem bude indukční léčba již s využitím nových léků (inhibitorů tyrosinových kináz, Bcl2 antagonistů a protilátek). Třetím krokem bude potom udržovací terapie tzv. „šitá na míru“ opět s využitím inhibitorů tyrosinových kináz, Bcl2 antagonistů a protilátek (192).



## 7. Stanovení individuální prognózy pacienta, vlastní výsledky

### 7.1. Vyšetřované prognostické faktory

Diagnóza CLL všech 417 pacientů vyšetřovaného souboru byla stanovena pomocí komplexu nezbytných vyšetření v souladu s kritérii NCI (1). Seznam námi použitých vyšetřovacích metod ke stanovení individuální prognózy uvádí v přehledu tabulka (Tabulka 8).

**Tabulka 8: Seznam provedených vyšetření**

Krevní obraz, absolutní počet lymfocytů
Stádium onemocnění dle Bineta
Sérové markery: B2M, sTk
Cytogenetika, FISH (delece 13q, 11q a 17p, trisomie 12), CGH
Mutační stav <i>IGHV</i>
Subgeny <i>IGHV3-21</i> , <i>IGHV1-69</i>
ZAP-70, CD38

### 7.2. Metody stanovení prognostických faktorů

#### 7.2.1. Metody cytogenetické a molekulárně cytogenetické

Materiálem pro cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření byly nádorové buňky získané z periferní krve. U všech pacientů byla provedena klasická cytogenetická analýza. Chromosomové aberace (delece 11q, 17p, a 13q a trisomie chromosomu 12) byly detekovány metodou FISH s použitím genových a centromerických sond (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). K ověření a bližší charakteristice chromosomových změn v karyotypu byly použity celochromosomové sondy (MetaSystems, Althusheim, Německo a Cambio, Cambridge, Velká Británie). Všechny vzorky byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného příslušnými fluorescenčními filtry a CCD kamerou a analyzovány pomocí softwaru ISIS (MetaSystems, Althusheim, Německo). Metoda CGH byla provedena u vybraných pacientů s komplexním karyotypem nebo u pacientů s nebalancovanými chromosomovými změnami,

které se nepodařilo určit metodou klasické cytogenetiky a FISH. Metoda CGH byla provedena podle návodu výrobce a byla popsána kolegy Jarošová a kolektiv (193).

### 7.2.2. Metoda stanovení mutačního stavu *IGHV* genů

Pro detekci mutačního stavu *IGHV* genů byla použita RNA získaná z nádorových lymfocytů periferní krve pacientů. Izolace mononukleárních buněk byla provedena separací na hustotním gradientu Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a celková buněčná RNA byla izolována pomocí TRIZOL Reagentu (Invitrogen, CARLSBAD, USA) dle návodu zveřejněného výrobcem. Reverzní transkripcí s náhodnými hexamery (Promega, Madison, USA) byl přepsán 1 µg RNA do komplementární DNA (cDNA). Získaná cDNA sloužila jako templát pro detekci monoklonální populace B lymfocytů metodou multiplexní polymerázové řetězové reakce (PCR) s využitím specifických V/J primerů ohraničujících *IGHV* oblast (194). PCR produkty byly separovány gelovou elektroforézou a monoklonální produkty byly purifikovány pomocí QIAquick® Gel Extraction kitu (Qiagen, HILDEN, Německo) dle návodu zveřejněného výrobcem. Sekvence *IGHV* genu byly získány přímým sekvenováním pomocí BigDye® Terminator v 1.1. Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems, CARLSBAD, USA) dle návodu zveřejněného výrobcem. Identifikace konkrétní *VDJ* přestavby *IGHV* genu, tj. stanovení podrodin (*IGHV3-21*, *IGHV1-69*) a určení mutačního stavu V subgenu bylo provedeno v databázi IMGT/V-QUEST (195). Nemutovaný stav *IGHV* genů byl stanoven na základě alespoň 98 % sekvenční homologie s odpovídajícím germinálním V subgenem (1 % koresponduje s 3 nukleotidovými mutacemi v *IGHV* genu) (27, 37).

### 7.2.3. Metoda stanovení ZAP-70 a CD38

V cytoplazmě nádorových lymfocytů byly izolovány mononukleární buňky krve na separačním médiu Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Pro vyšetření byla použita kombinace 5 monoklonálních protilátek: CD3 FITC (Immunotech, Marseille, Francie), ZAP-70 PE (klon 1E7.2, Caltag Laboratories, Burlingame, USA), CD16+CD56+ FITC, CD19 APC a CD5 PerCy (BD Biosciences, San Jose, USA). K permeabilizaci buněk byl použit kit Fix & Perm

(Caltag Laboratories, Carlsbad, USA), postupovali jsme podle pokynů výrobce. Permeabilizaci buněk předcházelo značení protilátkami anti-CD3, anti-CD16+CD56, anti-CD19 a anti-CD5. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA). Při měření bylo napočteno minimálně 1 500 T-lymfocytů a NK-buněk a pro hodnocení byl použit software CellQuest Pro. Bylo stanoveno procentuální zastoupení ZAP-70 pozitivních CLL buněk (CD19+/CD5+) a jako hranice positivity byla zvolena ve shodě s literárními daty přítomnost alespoň 20 % ZAP-70+ buněk v populaci nádorových lymfocytů (109). Povrchový znak CD38 byl vyšetřen metodou dvoubarevného značení s použitím MoAb CD19 FITC a CD38 PE (obě Immunotech & Beckman Coulter, Marseille, Francie). Jako hranice určení positivity, resp. negativity znaku CD38 byla zvolena hodnota 30 %.

#### 7.2.4. Metoda stanovení B2M a sTk

B2M byl stanovován imunoturbidimetricky na automatickém analyzátoru SPA Plus firmy The Binding Site (Birmingham, Velká Británie) za použití protilátek navázaných na polystyrenový latex.

Thymidinkináza byla stanovena za pomoci radioizotopové metody soupravou Thymidine Kinase REA kit firmy Beckman Coulter (California, USA). Normální rozmezí hodnot pro B2M je 0,8–2,34 mg/L a pro sTK 0–9 U/L.

#### 7.2.5. Metody statistické

Všechny statistické výpočty byly provedeny v open-source softwaru R (<http://www.r-project.org>). Primární sledovanou veličinou bylo OS. Křivky přežívání byly odhadovány Kaplan-Meierovou metodou a k testování rozdílů v přežívání mezi skupinami byl použit log-rank test. Prognostická síla jednotlivých parametrů byla odhadována na základě modelování přežívání pomocí univariantského i multivariantského Coxova regresního modelu proporcionálního rizika. Selektce parametrů v multivariantském Coxově regresním modelu byla provedena metodou postupné zpětné eliminace parametrů. V Coxově regresním modelu byl vždy testován předpoklad proporcionality rizika. Prediktivní síla regresního modelu byla vyjádřena prostřednictvím hodnoty konkordance (shoda mezi predikovanou a pozorovanou hodnotou přežívání),

kteřá odpovídala ploše pod odpovídající ROC křivkou (Receiver Operating Characteristic). Pro všechny analýzy byla nastavena hodnota hladiny významnosti 5 %.

### 7.3. Výsledky

#### 7.3.1. Charakteristika souboru pacientů

Sledovaný soubor tvořilo 417 pacientů (Tabulka 9). Medián doby sledování byl 50,7 měsíce (interval 0,26–280 měsíců).

Medián věku pacientů v době stanovení diagnózy byl 61 let (rozmezí věku bylo 27–87 let). Věk nad 65 let mělo 159 pacientů, tj. 38 % souboru a věk pod 55 let mělo celkem 104 pacientů, tj. 25 % souboru (Graf 4). Zastoupení mužů a žen bylo 270/147, poměr zastoupení mužů a žen byl 1,8:1. Graficky jsme demonstrovali zastoupení pacientů v klinických stádiích dle Bineta (Graf 5), zastoupení pacientů dle mutačního stavu *IGHV* (Graf 6) a dle výskytu rekurentních genetických aberací (Graf 7), popřípadě zastoupení vícečetných rekurentních aberací (Graf 8).

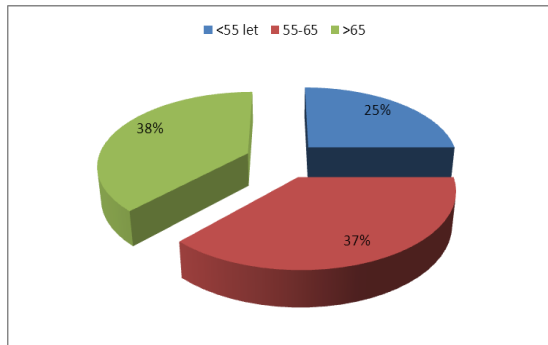
Pro všechny pacienty nebyla k dispozici kompletní sada výsledků prognostických faktorů, uveden je proto vždy počet provedených vyšetření pro daný prognostický parametr (Tabulka 10). Jako hranice prognostického významu stanovení B2M a sTk byla vzata horní hranice normy, pro B2M 2,34 mg/l a pro sTk 9U/l.

Celkem v průběhu sledování zemřelo 154 pacientů souboru, tj. 37 % pacientů.

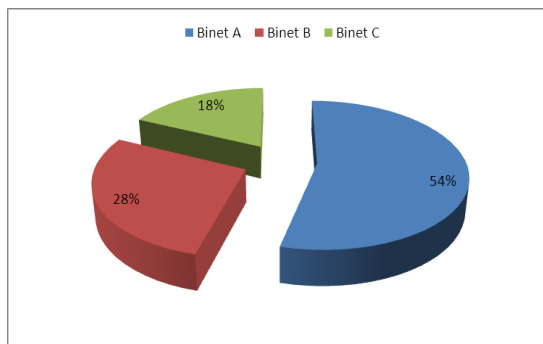
**Tabulka 9: Charakteristika pacientů souboru (n=417)**

Charakteristika	N	Medián	%	Rozmezí
Pacienti	417		100	
Medián věku		61 let		27–87
Věk ≤55 let	104		25	
Věk >65 let	159		38	
Muži/ženy	270 / 147		65 / 35	
Binet A / B / C	205/105/68		54 / 28 / 18	
Lymfocyty (10 <sup>9</sup> /l)	343	22,8		5,1–1115
Hemoglobin (g/l)	340	140,0		49–178
Trombocyty (10 <sup>9</sup> /l)	340	169,5		13–583
Mutovaný/nemutovaný <i>IGHV</i>	172/238		42/58	
Delece 13q/vyšetřeno celkem	169/366		46,2	
Trisomie 12/vyšetřeno celkem	46/380		12,1	
Delece 11q/vyšetřeno celkem	71/369		19,2	
Delece 17p/vyšetřeno celkem	29/379		7,7	
B2M (mg/l)	350	3,0		1,1–17,1
sTk (U/l) /vyšetřeno celkem	350	11,9		1,4–>100
ZAP-70 pozit./vyšetřeno celkem	140/175		80	
CD38 pozit./vyšetřeno celkem	43/347		12	
Subgen <i>IGHV3-21</i>	29		7	
Subgen <i>IGHV1-69</i>	51		12,4	
Léčeno	249		60	
Zemřelo	154		37	
Follow up (měsíce)		50,7		0,26–280

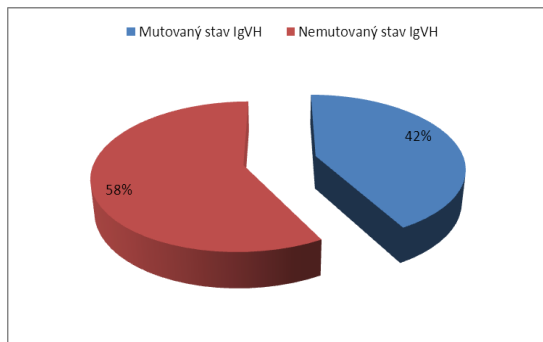
**Graf 4: Zastoupení nemocných dle věku**



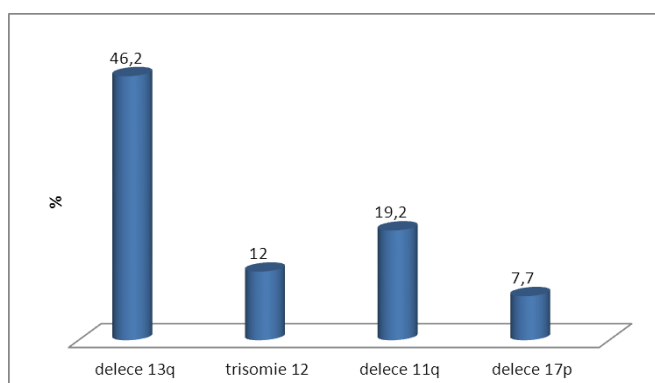
**Graf 5: Zastoupení nemocných dle stádia onemocnění dle Bineta**



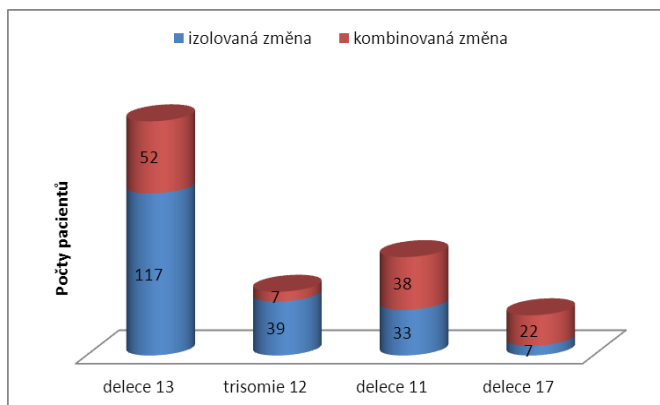
**Graf 6: Zastoupení nemocných dle mutačního stavu *IGHV***



**Graf 7: Výskyt rekurentních genetických změn**



**Graf 8: Zastoupení nemocných s výskytem izolovaných a kombinovaných rekurentních genetických změn**



Pokud byly blíže analyzovány rekurentní genetické změny, pak delece 17p se vyskytovala poměrně zřídka (7 pacientů) jako samostatná změna, častý byl její výskyt v kombinaci s jinými genetickými aberacemi (22 pacientů). V případě delece 11q bylo samostatné zastoupení této změny a změn v kombinaci s jinými aberacemi rovnoměrné (33 pacientů se samostatnou změnou a 38 pacientů v kombinaci s jinou aberací). U trisomie 12 byl naopak častý samostatný výskyt této rekurentní aberace (39 pacientů), pouze v 7 případech byla prokázána tato změna v kombinaci. V případě nejčastější změny – delece 13q (46,2 % všech pacientů) – se u větší části pacientů (117 pacientů, 69 %) změna vyskytovala samostatně, u menšího počtu (52 pacientů, 31 %) byla pak nalezena změna další (Graf 8).

#### 7.3.1.1. Zastoupení VH rodin souboru

Zastoupení jednotlivých VH rodin ukazuje tabulka (Tabulka 10). VH3 rodina byla zastoupena nejčastěji (49,6 %), následována VH1 rodinou (25,9 %). V rámci VH1 rodiny byl subgen *IGHV1-69* zastoupen v 47,2 % (51 pacientů). V rámci VH3 rodiny je subgen *IGHV3-21* zastoupen ve 14 % (29 pacientů).

**Tabulka 10: Zastoupení rodin subgenů v souboru**

Rodina VH	Pacienti (počet)	Pacienti (%)
V1	108	25,9
V2	12	2,8
V3	207	49,6
V4	71	17,0
V5	15	3,6
V6	1	0,2
V7	3	0,7

### 7.3.1.2. Léčba nemocných

Celkem bylo k léčbě v průběhu sledování indikováno 249 pacientů (60 %). Léčba pacientů byla vedena individuálně zejména s ohledem na věk, stav fyzické výkonnosti a přidružená onemocnění. Mladší pacienti byli v první linii léčení především režimem FC nebo FM, respektive od roku 2005 kombinovanou chemoimunoterapií FCR v uvedeném dávkování (fludarabin 40mg/m<sup>2</sup> 1.–3. den, cyklofosfamid 250mg/m<sup>2</sup> 1.–3. den a rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> v prvním cyklu a od druhého cyklu 500mg/m<sup>2</sup>). Starší a komorbidní pacienti byli léčení v první linii zejména chlorambucilem nebo FCR v redukované dávce dle protokolu Q lite (179). V případě pacientů s hemolytickou anémií a aktivitou nemoci byl použit režim R-COP nebo R-CHOP.

### 7.3.2. Charakteristika podsouboru pacientů se subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69*

Zvláštní pozornost byla věnována analýze pacientů se subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69*. Pacientů se subgenem *IGHV3-21* bylo 29, tj. 7 % celého souboru pacientů. Pacientů se subgenem *IGHV1-69* celkem bylo 51, tj. 12,4 % celého souboru pacientů. Podsoubory jsou detailně charakterizovány v tabulce (Tabulce 11).

U subgeny *IGHV3-21* bylo zastoupení mutovaného a nemutovaného stavu *IGHV* mírně ve prospěch mutovaného stavu (55 % vs 45 %), u subgeny *IGHV1-69* bylo téměř výhradně popsáno zastoupení nemutovaného stavu *IGHV*



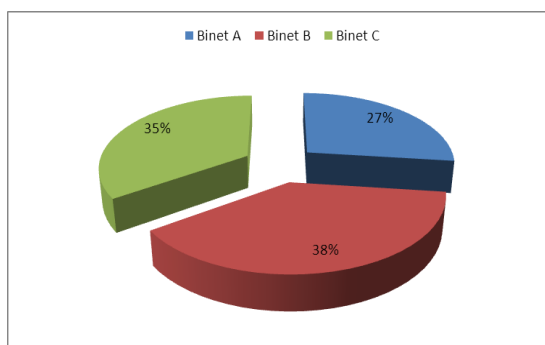
(98 %). Medián počtu mutací u *IGHV3-21* s mutovaným stavem byl 3,4 % (rozmezí 2,1–6,6).

**Tabulka 11: Charakteristika pacientů se subgeny *IGHV3-21* (n=29) a *IGHV1-69* (n=51)**

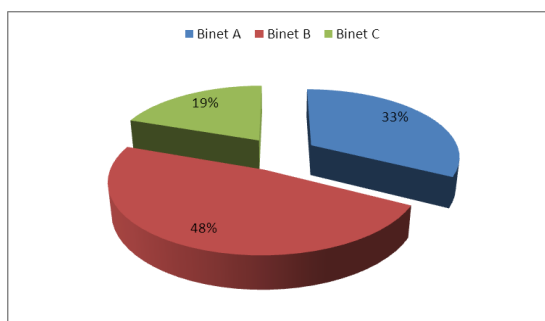
	<i>IGHV3-21</i> (N=29)				<i>IGHV1-69</i> (N=51)			
	Me	N	Rozmezí	%	Me	N	Rozmezí	%
Pohlaví M/Ž		17/12		59/41		39/12		77/23
Lymfocyty(10 <sup>9</sup> /l)	35,8		5,2–346		35,5		6,4–1115	
Věk	62,8		35,6–78,7		59,5		36,1–83	
Binet A/B/C		7/10/9		27/38/35		15/22/9		33/48/19
Nemut/mut <i>IGHV</i>		13/16		45/55		50/1		98/2
B2M(mg/l)	3,61		1,77–9,29		3,19		1,31–7,97	
<2,34		5		22		8		19
>2,34		18		78		34		81
sTk(U/l)	18,7		5,2–101		18,4		3,4–101	
<9		5		23		11		26
>9		17		77		31		74
Delece 11q		6		25		14		35
Delece 17p		3		10,7		3		7,1
Stereotypní BCR Subset #2		13		45				
Léčeno		26		90		42		82
TFS (měsíce)	8,9		4,1–63,0		9,0		2,2–29,8	
Clb/FC(R)/(R)C(H)OP		8/11/7		31/42/27		4/32/6		10/76/14
CR/PR/SD/PD		7/9/6/2		30/37/25/8		8/14/8/7		22/38/22/19
Zemřelo		14		48		28		55
OS(měsíce)	97		55–nedosažen		85		61–128	
Follow-up (měsíce)	58		10–136		50,5		7–140	

Následující grafy demonstrují u subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* častější zastoupení pacientů v pokročilých stádiích nemoci dle Bineta (Graf 9 a 10).

**Graf 9: Zastoupení nemocných se subgenem *IGHV3-21* dle stádia onemocnění dle Bineta**



**Graf 10: Zastoupení nemocných se subgenem *IGHV1-69* dle stádia onemocnění dle Bineta**



### 7.3.3. Analýza významu prognostických faktorů ve vztahu k OS

Medián OS souboru 417 pacientů byl 105 měsíců (95% CI: 95–118). Univariantní a multivariantní Coxův regresní model proporcionálního rizika (HR) zhodnotil na základě modelování přežívání prognostickou sílu jednotlivých klinických a biologických prognostických faktorů (Tabulka 12).

#### 7.3.3.1. Univariantní statistická analýza

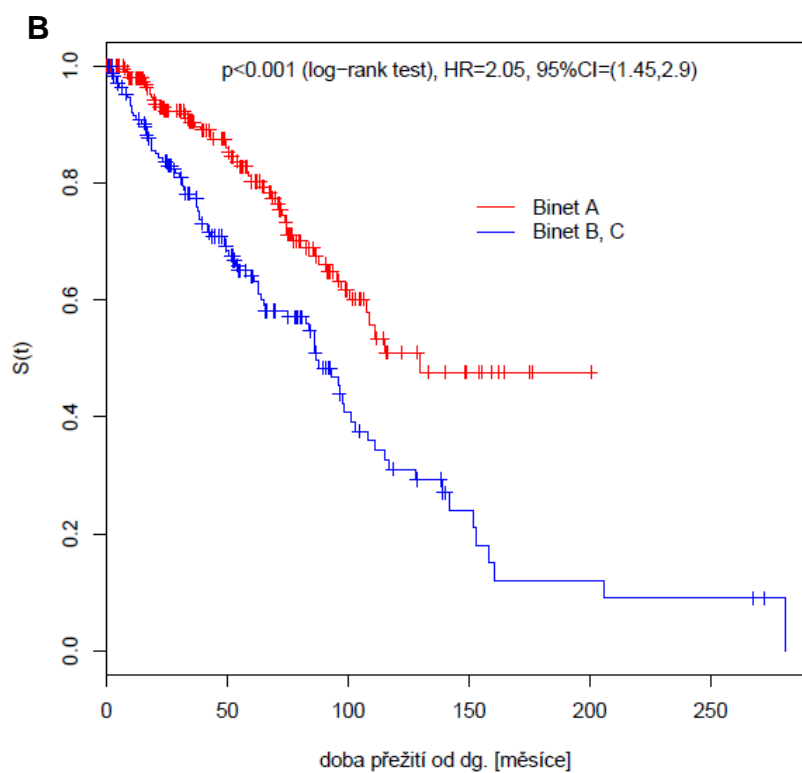
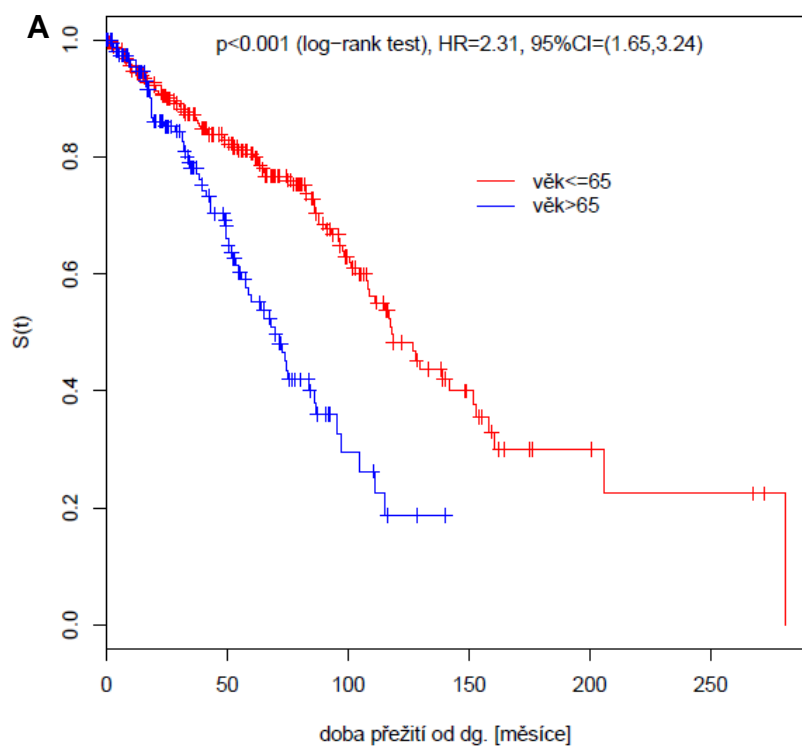
Jako statisticky významné pro OS v univariantní analýze se ukázaly být tyto prognostické faktory: věk, věk > 65 let ( $p < 0,001$ ), počet lymfocytů >  $50 \times 10^9/l$  ( $p < 0,001$ ), počet lymfocytů >  $30 \times 10^9/l$  ( $p < 0,001$ ), stádium onemocnění Binet B a C ve srovnání se stádiem Binet A ( $p < 0,001$ ) (Tabulka 12), (Obrázek 19A,B, 20A, 23B). Ve statistické analýze nebylo mužské pohlaví sledáno jako prognosticky nepříznivý faktor pro OS pacientů ( $p < 0,314$ ) (Tabulka 12), (Obrázek 20B).

**Tabulka 12: Prognostický význam parametrů, univariantsní a multivariantsní Coxův regresní model proporcionálního rizika (HR) celého souboru (n=417)**

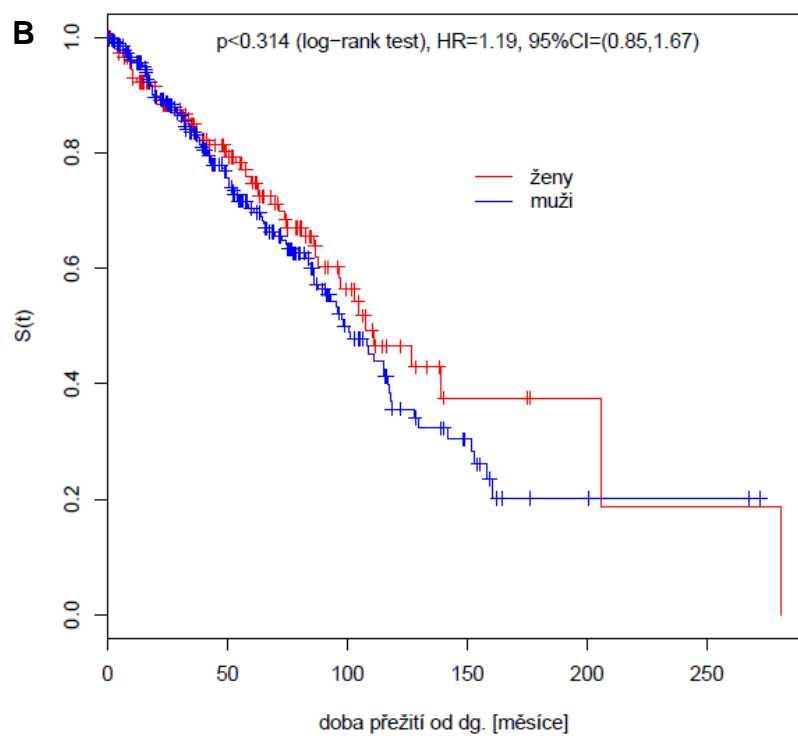
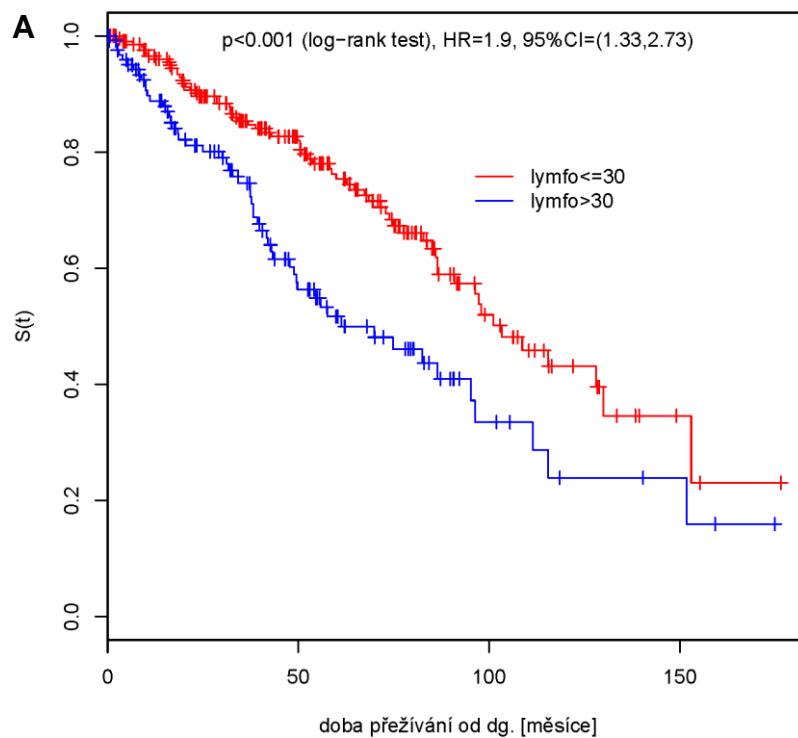
	Univariantsní analýza			Multivariantsní analýza		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Soubor nemocných (n=417)						
věk>65 let	2,31	1,65–3,24	<0,001	2,2	1,48–3,28	<0,001
mužské pohlaví	1,19	0,85–1,67	<0,314			
Lymfocyty > 50×10 <sup>9</sup> /l	2,04	1,38–3,02	<0,001	1,82	1,18–2,80	<0,05
Lymfocyty > 30×10 <sup>9</sup> /l	1,9	1,33–2,73	<0,001			
Stádium Binet B,C	2,05	1,45–2,9	<0,001			
B2M > 2,34 mg/l	2,99	1,81–4,94	<0,001			
sTk > 9 U/l	2,6	1,72–3,94	<0,001			
Mutovaný stav <i>IGHV</i>	0,35	0,24–0,51	<0,001	0,49	0,31–0,76	<0,05
Delece 17p	2,39	1,43–3,98	<0,001	2,13	1,17–3,87	<0,05
Delece 11q	1,56	1,04–2,33	<0,05			
Subgen <i>IGHV1-69</i>	1,57	1,04–2,37	<0,05			
Subgen <i>IGHV3-21</i>	1,09	0,63–1,89	<0,769			
Mutovaný <i>IGHV</i> a subgen <i>IGHV3-21</i> / nemutovaný <i>IGHV</i> celého souboru	0,64	0,29–1,37	<0,245			
ZAP-70	1,0	0,47–2,13	<0,996			
CD38	0,93	0,45–1,92	<0,85			

Jako statisticky významné pro celkové OS se v univariantsní analýze projeví dále tyto prognostické faktory: B2M > 2,34 mg/l ( $p < 0,001$ ), sTk > 9 U/l ( $p < 0,001$ ), delece 17p ( $p < 0,001$ ) a delece 11q ( $p < 0,05$ ) (Obrázek 21 A, B, 22 A, B) a nemutovaný stav *IGHV* ( $p < 0,001$ ) (Obrázek 23A). Medián OS souboru pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* byl 86 měsíců (95% CI: 75–101), s mutovaným stavem *IGHV* byl 206 měsíců (95% CI: 130–nedosažen). Nebyl prokázán prognostický význam stanovení biologických prognostických faktorů ZAP-70 ( $p < 0,996$ ) a positivity CD38 antigenu ( $p < 0,85$ ) (Obrázek 24A,B).

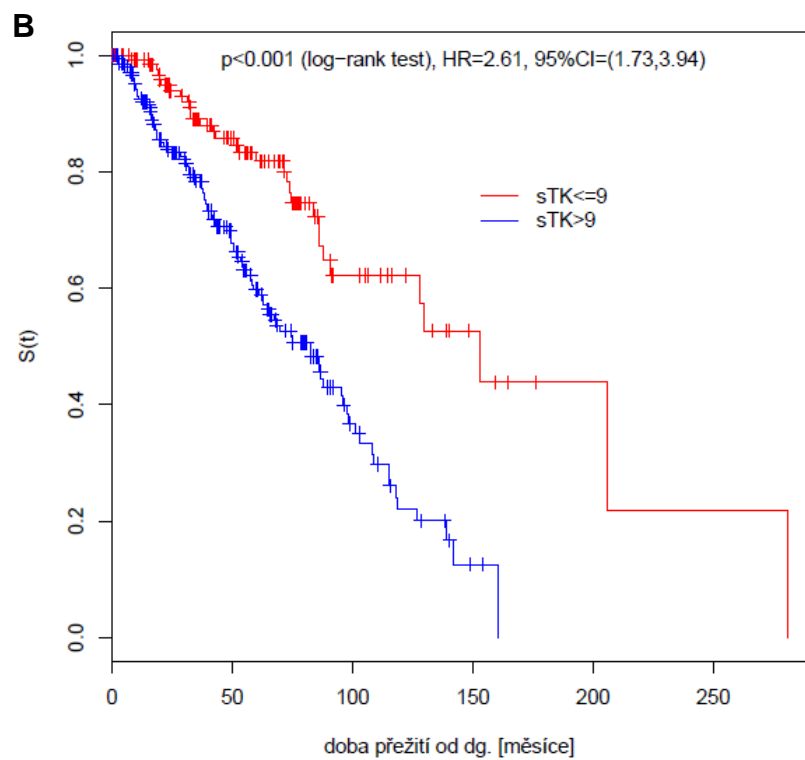
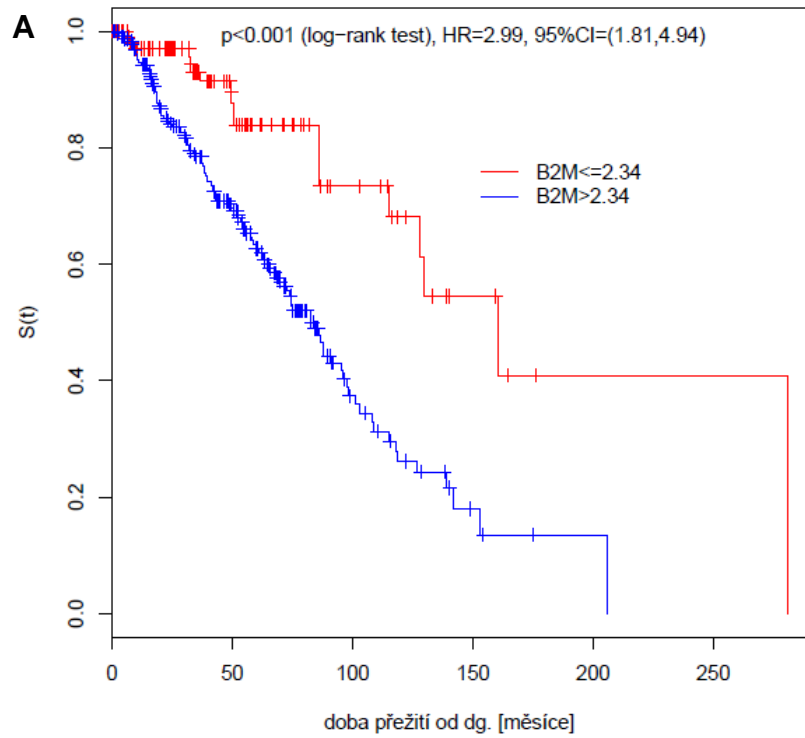
**Obrázek 19: Vliv klasických prognostických faktorů na OS nemocných:  
(A) věk > 65 let, (B) klinické stádium Binet B nebo C**



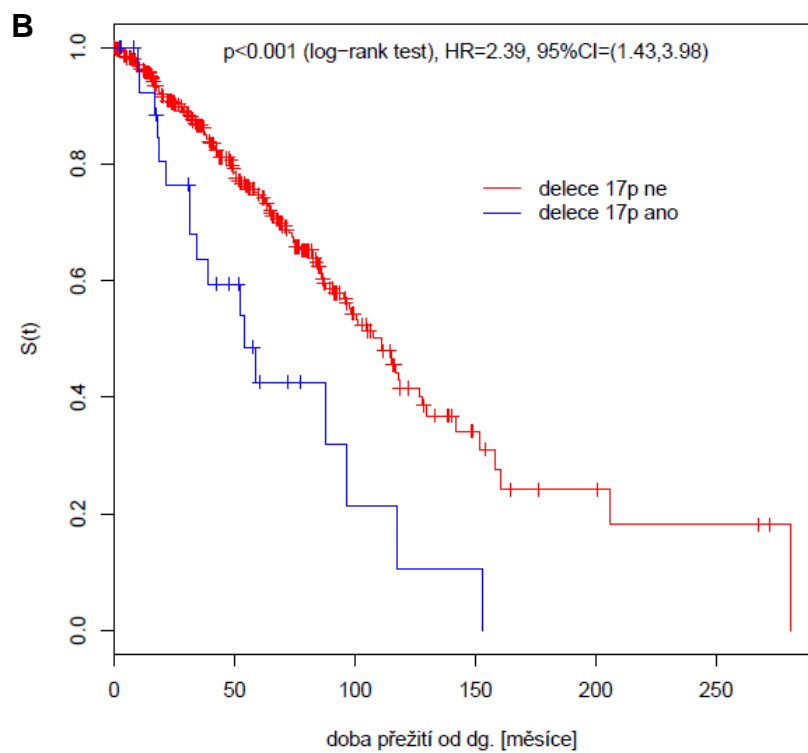
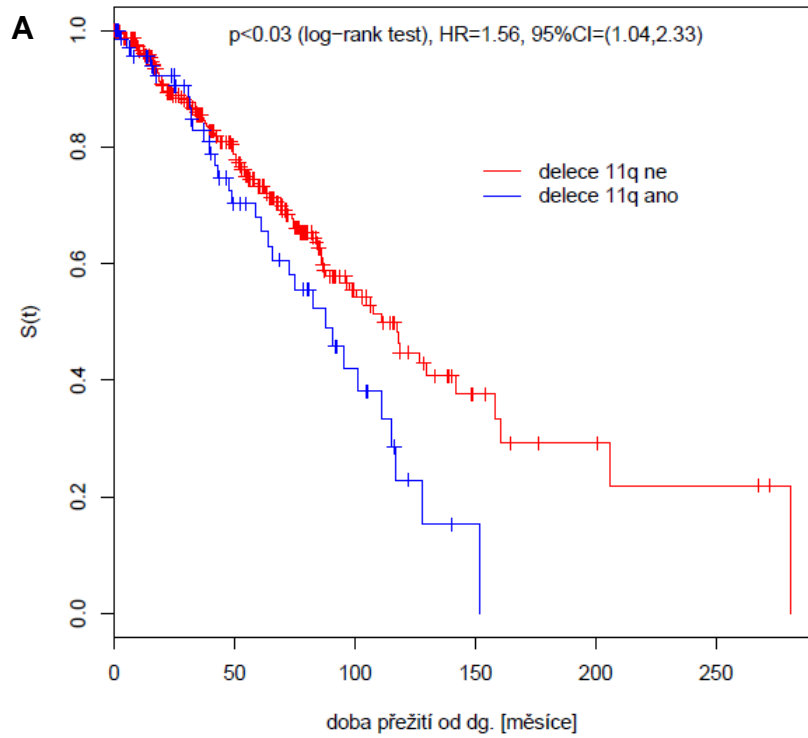
**Obrázek 20 : Vliv klasických prognostických faktorů na OS nemocných: (A) počet lymfocytů  $> 30 \times 10^9/l$ , (B) mužské pohlaví**



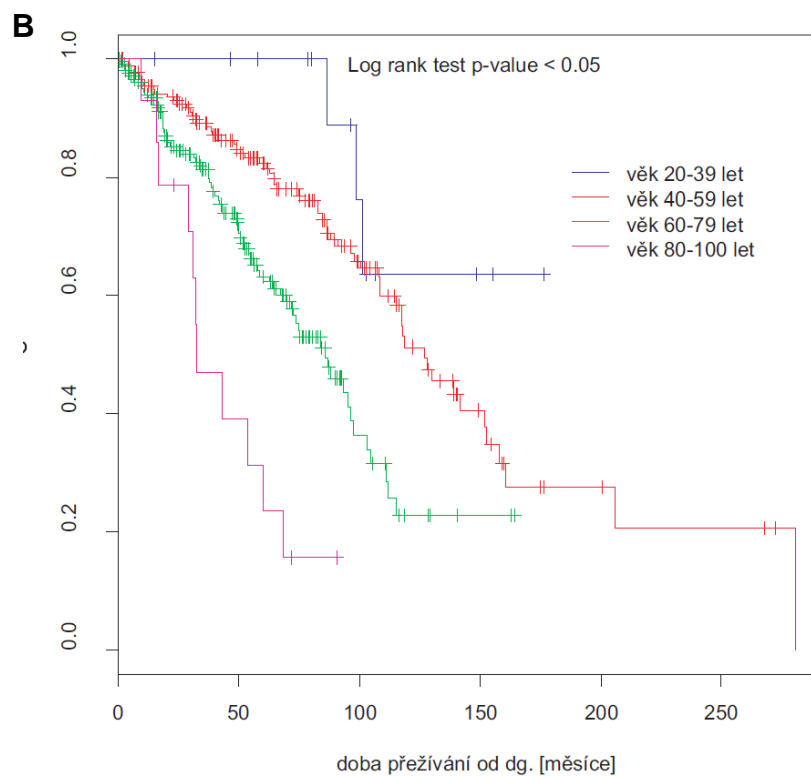
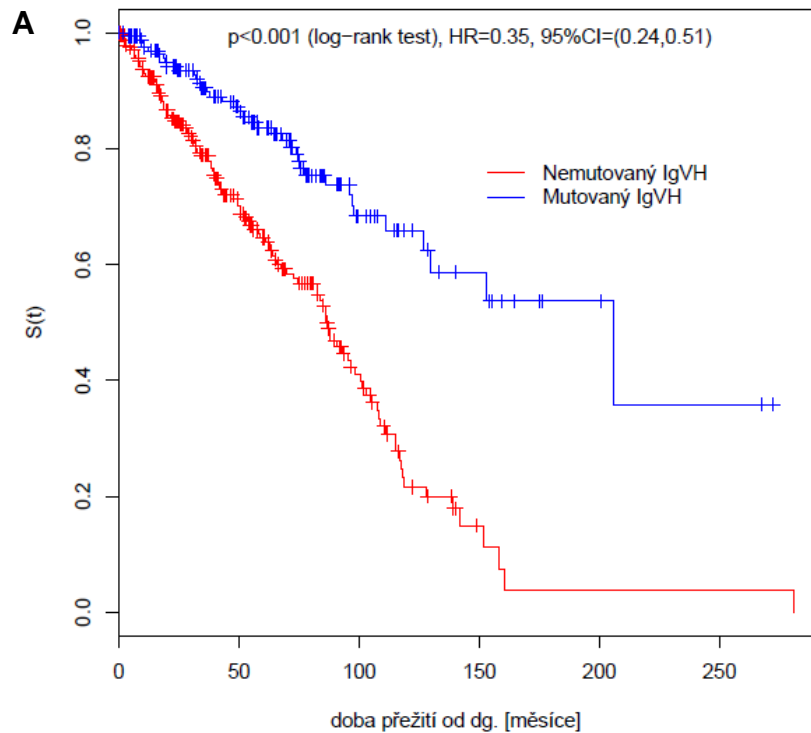
**Obrázek 21 : Vliv biologických faktorů na OS nemocných: (A) B2M, (B) sTk.**



Obrázek 22 : Vliv biologických faktorů na OS nemocných: (A) delece 11q, (B) delece 17p.

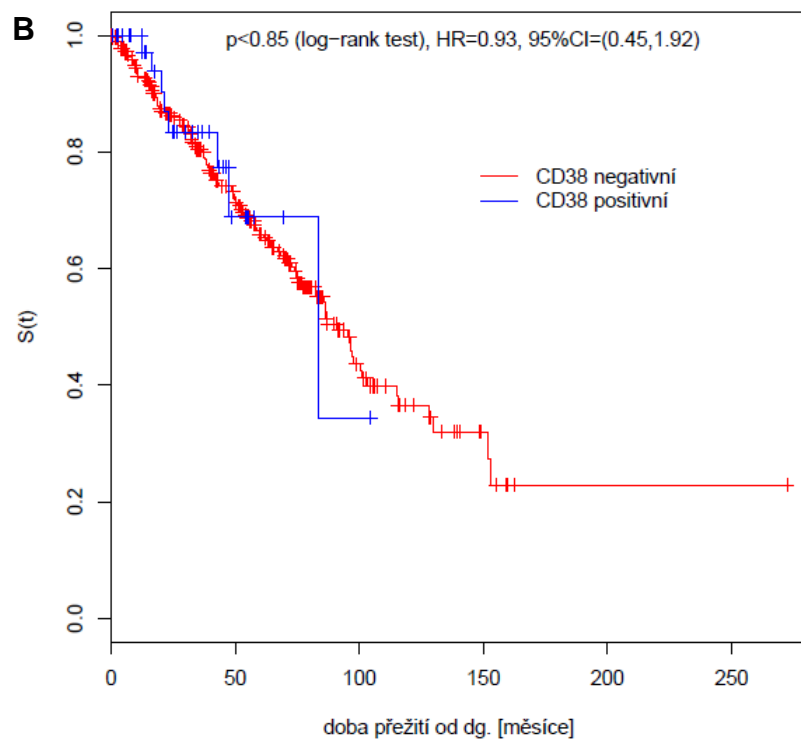
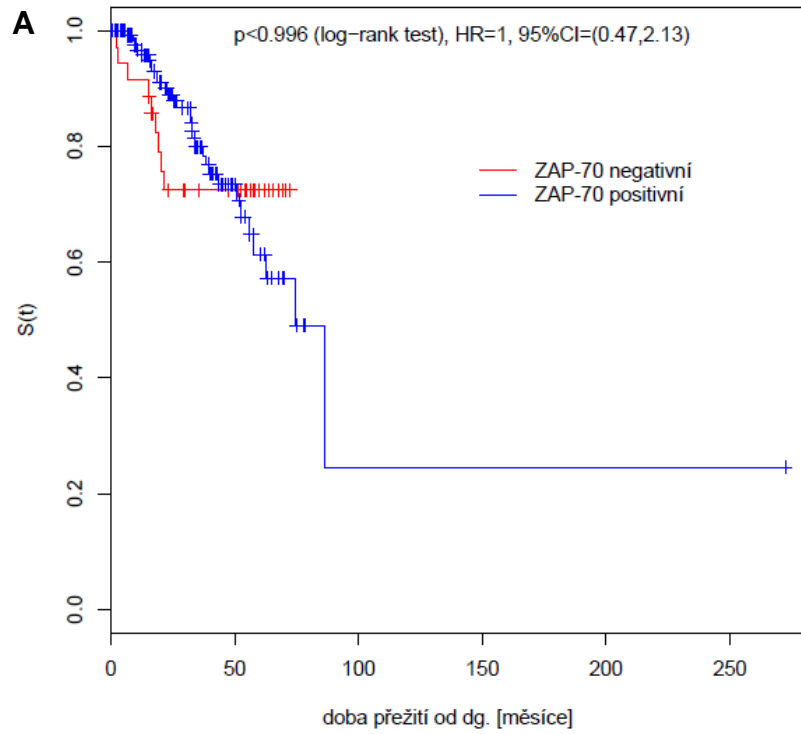


**Obrázek 23: Vliv mutačního stavu IgVH (A) a věku (B) na OS nemocných.**





**Obrázek 24: Vliv biologických faktorů na OS nemocných: (A) ZAP-70, (B) CD38.**



### 7.3.3.2. Multivariantní statistická analýza

Do základního modelu multivariantní analýzy vstoupily tyto proměnné: věk > 65 let, počet lymfocytů >  $50 \times 10^9/l$ , stádium onemocnění dle Bineta, přítomnost delece 11q nebo 17p, přítomnost subgeneru *IGHV3-21*, hodnoty B2M > 2,34 mg/l, sTk > 9 U/l, mutační stav *IGHV*. *IGHV1-69* nebyl do multivariantní analýzy zařazen pro závislost na nemutovaném stavu *IGHV*. Pohlaví, pozitivita ZAP-70 a CD38 antigen nebyly nezařazeny pro neprokázaný statistický význam v univariantní analýze.

Prvotně byl stanoven základní model multivariantní analýzy a poté výběr prostřednictvím funkce „select Cox“, což je algoritmus zpětné selekce regresorů. Pro základní model regresní analýzy se vždy vybírají kompletní pozorování, zatímco ve výběru na základě zpětné selekce jsou využita všechna pozorování. Pro multivariantní analýzu celého souboru pacientů a pro multivariantní analýzu pacientů ve stádiu Binet A byl použit výsledek kompletní sady regresorů, pro analýzu pacientů s mutovaným stavem *IGHV* byl použit model všech regresorů.

Statisticky významné pro OS celého souboru pacientů v multivariantní analýze se ukázaly být tyto prognostické faktory: věk > 65 let ( $p < 0,001$ ), nemutovaný stav *IGHV*, delece 17p a počet lymfocytů >  $50 \times 10^9/l$ . Index konkordance pro Coxův regresní model byl 0,669.

Statisticky významné pro OS pacientů ve stádiu Binet A v multivariantní analýze se ukázaly být tyto prognostické faktory: věk > 65 let ( $p < 0,001$ ), nemutovaný stav *IGHV* ( $p < 0,04$ ), přítomnost subgeneru *IGHV3-21* ( $p < 0,019$ ), naopak nebyl prokázán význam delece 11q ( $p < 0,08$ ). Index konkordance pro Coxův regresní model byl 0,736.

Statisticky významné pro OS pacientů s mutovaným stavem *IGHV* v multivariantní analýze se ukázal být pouze věk > 65 let ( $p < 0,032$ ). Index konkordance pro Coxův regresní model byl 0,71.

#### 7.3.4. Prognostický význam subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* ve vztahu k OS

Univariální analýzou nebyl prokázán rozdíl v OS u nemocných s přítomností subgenu *IGHV3-21* a nemocných bez tohoto subgenu ( $p < 0,769$ ) (Obrázek 25A). Medián OS podsouboru 29 pacientů se subgenem *IGHV3-21* byl 97 měsíců (95% CI: 55–nestanoven).

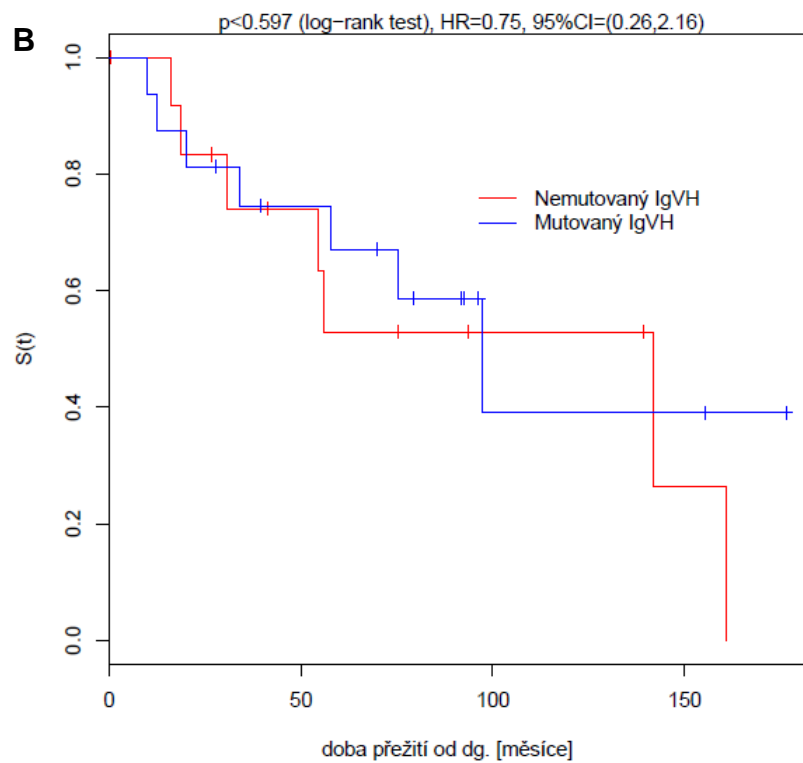
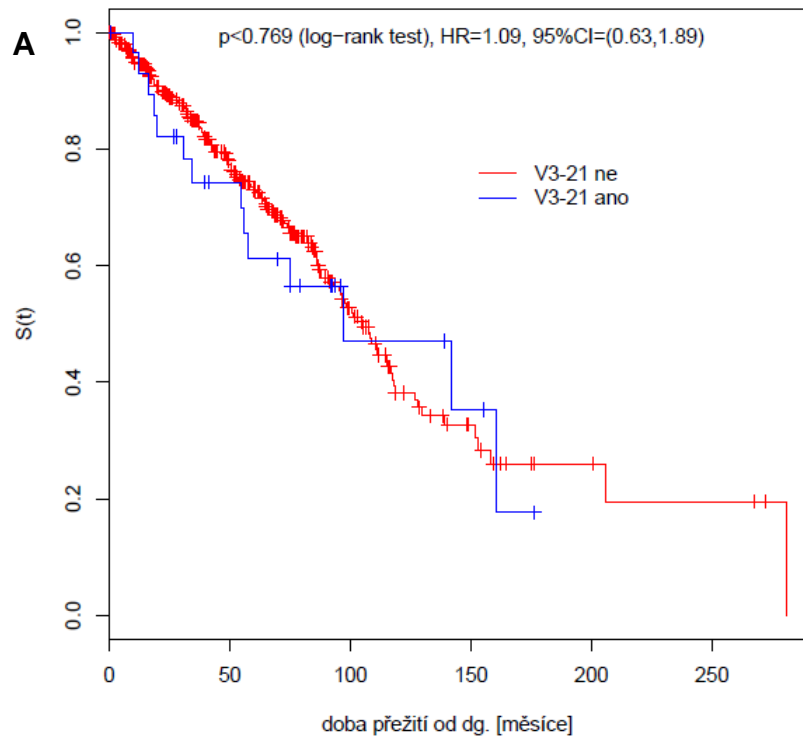
Soubor pacientů s přítomností subgenu *IGHV3-21* byl stran prognostického významu k OS podrobněji. Pokud byl podsoubor *IGHV3-21* rozdělen dle mutačního stavu *IGHV*, pak log-rank test neprokázal statisticky významný rozdíl v OS mezi pacienty a mutovaným a nemutovaným stavem *IGHV* ( $p < 0,597$ ) (Obrázek 25 B). Dále byli log-rank testem porovnání *IGHV3-21* pozitivní pacienti s mutovaným stavem *IGHV* s pacienty celého souboru s nemutovaným stavem *IGHV*. Ani zde nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v OS ( $p < 0,245$ ) (Obrázek 26 A). Log-rank testem bylo analyzováno OS skupiny pacientů se subgenem *IGHV3-21* a subgenem *IGHV1-69*, statisticky významný rozdíl v OS zde také nebyl patrný ( $p < 0,302$ ) (Obrázek 26 B).

Jako prognosticky nepříznivý faktor pro OS byl v univariální analýze identifikován subgen *IGHV1-69* ( $p < 0,05$ ). Medián OS podsouboru 51 pacientů se subgenem *IGHV1-69* byl 85 měsíců (95% CI: 61–128) (Obrázek 27).

**Obrázek 25 : Vliv subgenu *IGHV3-21* na OS nemocných.**

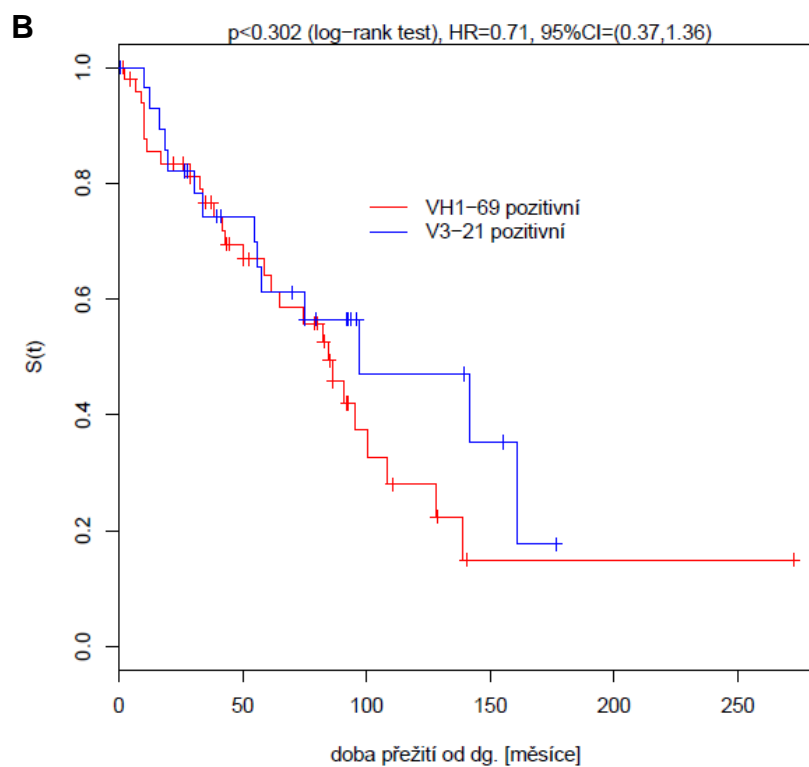
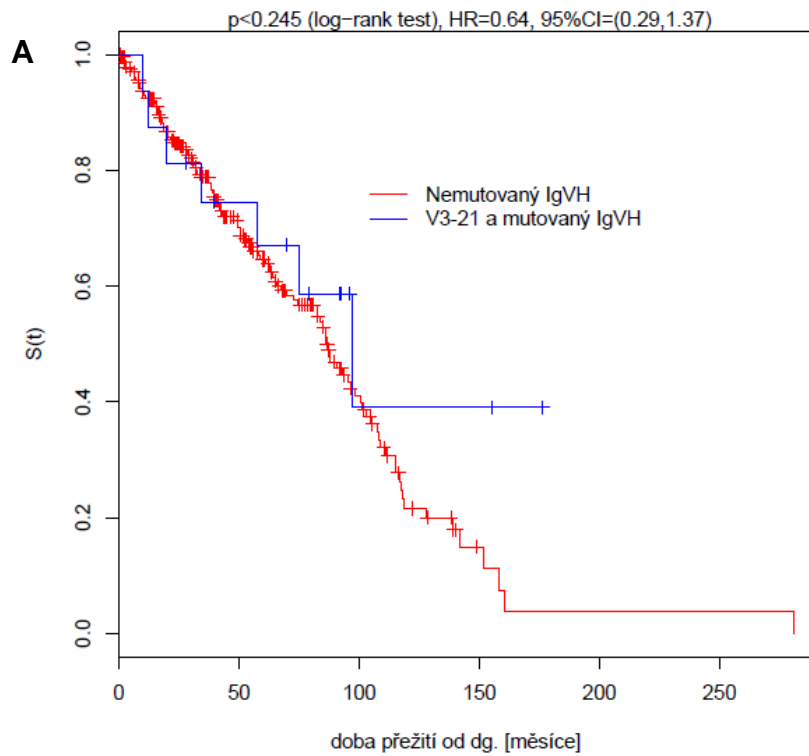
(A) Srovnání OS v závislosti na přítomnosti subgenu *IGHV3-21*.

(B) Srovnání OS nemocných se subgenem *IGHV3-21* v závislosti na mutačním stavu *IGHV*.

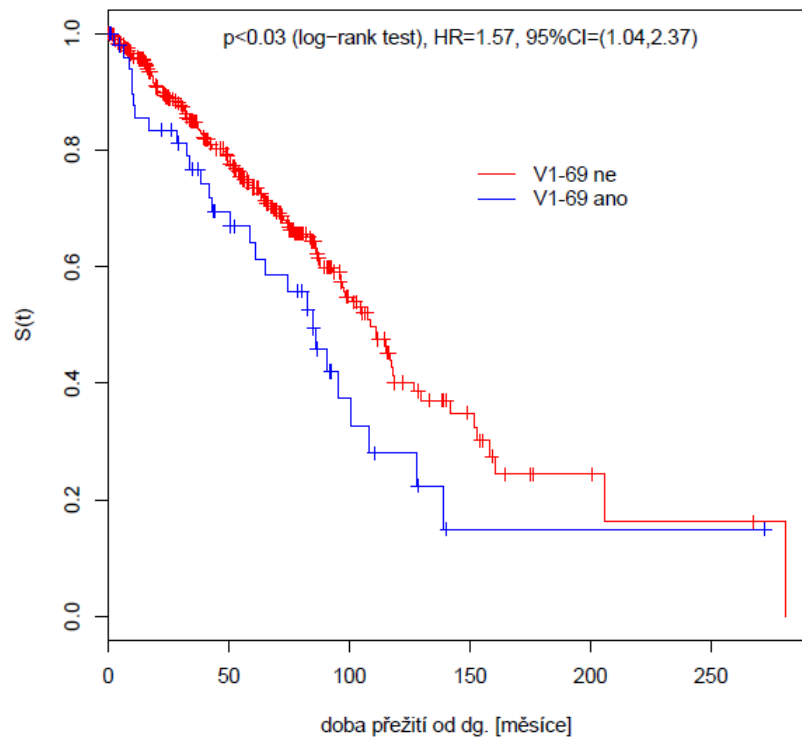


**Obrázek 26: Vliv přítomnosti subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69* na OS.**

(A) Srovnání OS nemocných se subgenem *IGHV3-21* a mutovaným stavem *IGHV* s nemocnými celého souboru s nemutovaným *IGHV*. (B) Srovnání OS nemocných se subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69*



**Obrázek 27 : Vliv přítomnosti subgenu *IGHV1-69* na OS nemocných.**  
Srovnání OS nemocných v závislosti na přítomnosti subgenu *IGHV1-69*



### 7.3.5. Analýza významu ostatních prognostických faktorů u subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* ve vztahu k OS

Výsledky univariální analýzy všech vybraných prognostických faktorů ve vztahu k OS u pacientů s přítomností subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 13).

**Tabulka 13: Univariální analýza vybraných prognostických faktorů u pacientů s přítomností subgenů *IGHV3-21* (n=29) a *IGHV1-69* (n=51) ve vztahu k OS pacientů**

	Univariální analýza					
	<i>IGHV3-21</i>			<i>IGHV1-69</i>		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Věk > 65 let	9,36	2–43,8	<0,001	1,08	0,48–2,41	<0,850
Počet lymfocytů > 50×10 <sup>9</sup> /l	4,06	0,96–17,24	<0,05	1,93	0,83–4,48	<0,119
Stádium Binet B,C	2,95	0,64–13,65	<0,149	1,27	0,52–3,14	<0,600
B2M (mg/l) > 2,34 mg/l	–	–	–	0,98	0,33–2,93	<0,975
sTk > 9 U/l	5,74	0,74–44,6	<0,06	1,02	0,38–2,79	<0,963
Nemutovaný stav <i>IGHV</i>	0,75	0,26–2,16	<0,597			
FISH 17p-	4,7	0,9–24,46	<0,05	8,7	2,61–29	<0,001
FISH 11q-	1,01	0,21–4,79	<0,986	0,95	0,38–2,37	<0,917
<i>IGHV3-21</i> mutovaný stav /nemutovaný stav celého souboru	0,64	0,29–1,37	<0,245			
Stereotypní BCR, subset #2	1,57	0,48–5,15	<0,456			

U pacientů se subgenem *IGHV3-21* a s některým z dalších nepříznivých prognostických faktorů jsme log-rank testem prokázali horší OS než u pacientů *IGHV3-21* bez těchto prognostických faktorů. Mezi tyto faktory patřil věk > 65 let ( $p < 0,001$ ), počet lymfocytů > 50×10<sup>9</sup>/l ( $p < 0,05$ ). Hodnota sTk > 9 U/l má pouze hraniční prognostickou hodnotu ( $p < 0,06$ ), prognostický význam hodnoty B2M > 2,34 mg/l nelze spolehlivě stanovit pro malý počet pozorování. Stanovení mutačního stavu *IGHV* u podsouboru *IGHV3-21* prognostickou roli

nehraje ( $p < 0,597$ ), stejně tak stanovení stádia onemocnění Binet B a C ( $p < 0,149$ ).

Přesné stanovení prognostického významu delece 11q a 17p je u tohoto podsouboru zatím obtížné pro malý počet pozorování. Pacienti se subgenem *IGHV3-21* měli v šesti případech delecí 11q a ve třech případech delecí 17p (Tabulka 11). Pacienti se subgenem *IGHV3-21* s delecí 17p měli horší OS než pacienti bez delece ( $p < 0,005$ ), pacienti s delecí 11q neměli horší OS než pacienti bez delece 11q ( $p < 0,986$ ) (Obrázek 28 A, 29 A).

U pacientů s přítomností subgenu *IGHV1-69* bylo prokázáno, že věk  $> 65$  let ( $p < 0,850$ ), počet lymfocytů  $> 50 \times 10^9/l$  ( $p < 0,119$ ), stádium onemocnění Binet B a C ( $p < 0,600$ ), hodnoty B2M  $> 2,34$  mg/l ( $p < 0,975$ ) a sTk  $> 9$  U/l ( $p < 0,969$ ) nemají další prognostický význam (Tabulka 13).

Vzhledem k nízkému počtu pacientů s delecí 17p bylo obtížné hodnotit prediktivní význam této aberace. Celkem 3 pacienti s delecí 17p a subgenem *IGHV1-69* měli horší OS než pacienti *IGHV1-69* bez této delece ( $p < 0,001$ ). U pacientů se subgenem *IGHV1-69* bylo identifikováno 12 pacientů s delecí 11q, tj. celkem 30 %, prognostický význam delece u tohoto podsouboru pacientů prokázán nebyl ( $p < 0,917$ ) (Obrázek 28B, 29B).

#### 7.3.6. Analýza TFS u subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* a u stereotypního BCR subset #2

TFS byl u pacientů s *IGHV3-21* 9 měsíců (rozmezí 4–63), TFS u pacientů *IGHV1-69* byl taktéž 9 měsíců (rozmezí 2–30) (Obrázek 30 A, B).

Srovnáván byl dále TFS a OS u pacientů se subgenem *IGHV3-21* se stereotypním BCR subset #2 a pacientů bez tohoto stereotypního receptoru (non subset #2). Log-rank testem nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v TFS ( $p < 0,134$ ) ani v OS ( $p < 0,938$ ) (Obrázek 31 A, B).



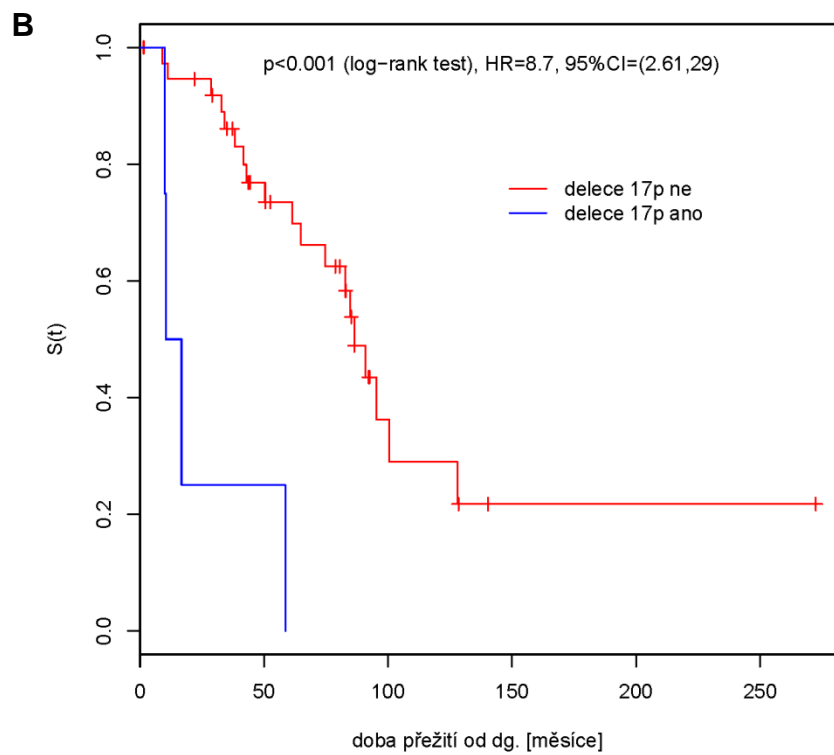
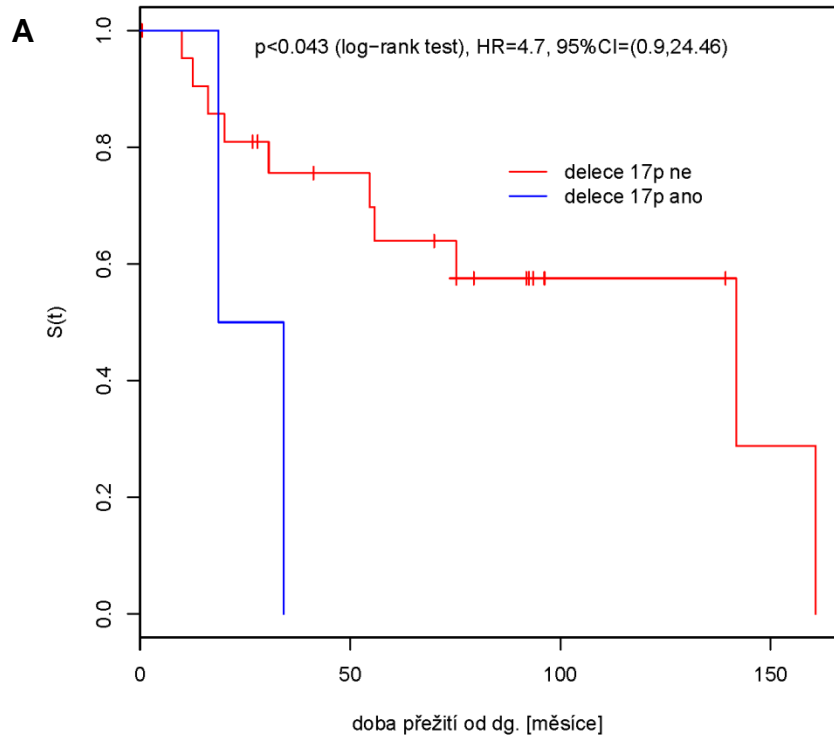
### 7.3.7. Srovnání výskytu rekurentních cytogenetických změn u subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* a u stereotypního BCR subset #2

Práce dále analyzovala výskyt rekurentních cytogenetických změn (delece 11q, delece 17p, delece 13q a trisomie 12) detekovaných metodou FISH u nemocných s přítomností subgenů *IGHV3-21* (subset #2 a non-subset #2) (Tabulka 14 a 15). Byl popsán výskyt rekurentních cytogenetických změn u nemocných s přítomností subgenů *IGHV1-69* a tento výskyt byl srovnán s výskytem rekurentních změn u celého souboru pacientů (Tabulka 15).

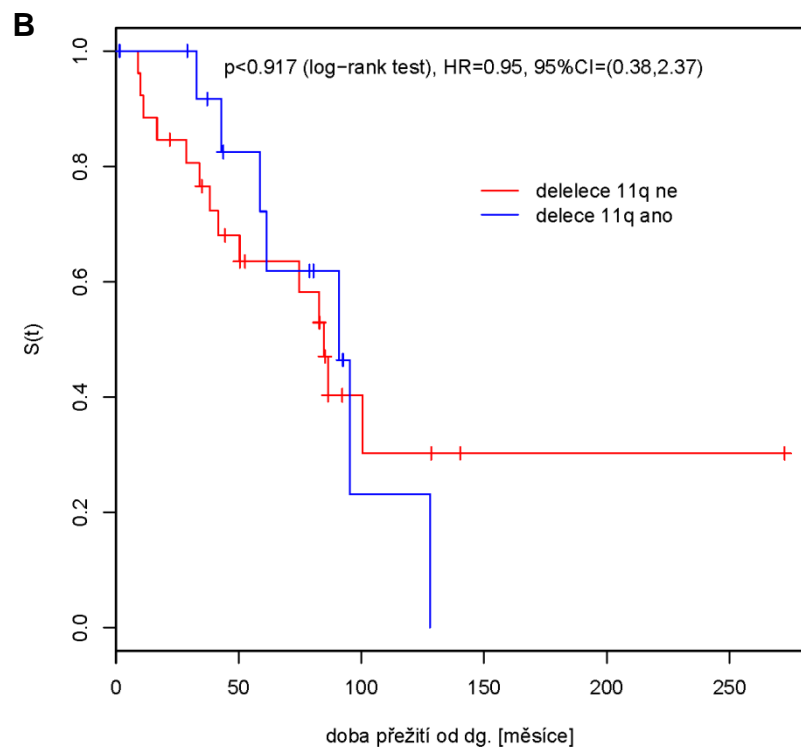
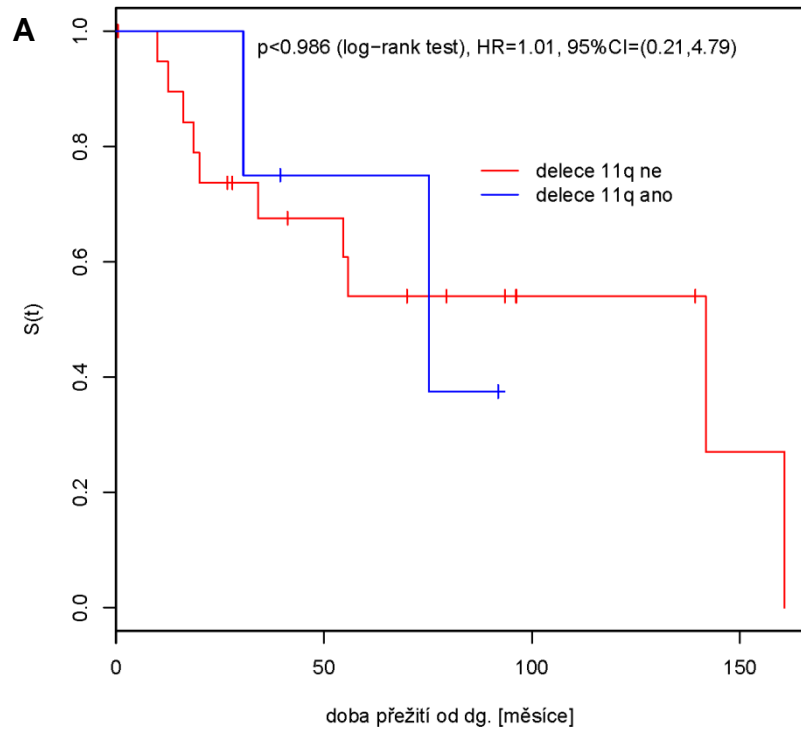
U stereotypního BCR subset #2 *IGHV3-21* bylo prokázáno vyšší zastoupení delece 13q (81 %), když výskyt delece 13q byl pro srovnání v celém souboru pacientů v 46 %. Dále bylo u stereotypního BCR subset #2 *IGHV3-21* prokázáno vyšší zastoupení delece 11q (31 %), když výskyt delece 11q v celém souboru pacientů byl 19 %. Žádný ze 3 pacientů s přítomností subgenů *IGHV3-21* s delecí 17p neměl stereotypní BCR subset #2.

U pacientů s přítomností subgenů *IGHV1-69* byla častěji zastoupena delece 11q (35 %) ve srovnání s výskytem v celém souboru pacientů (19 %). Statistické testování nebylo pro četnost pozorování prováděno, pouze bylo provedeno v následné diskuzi srovnání s literaturou.

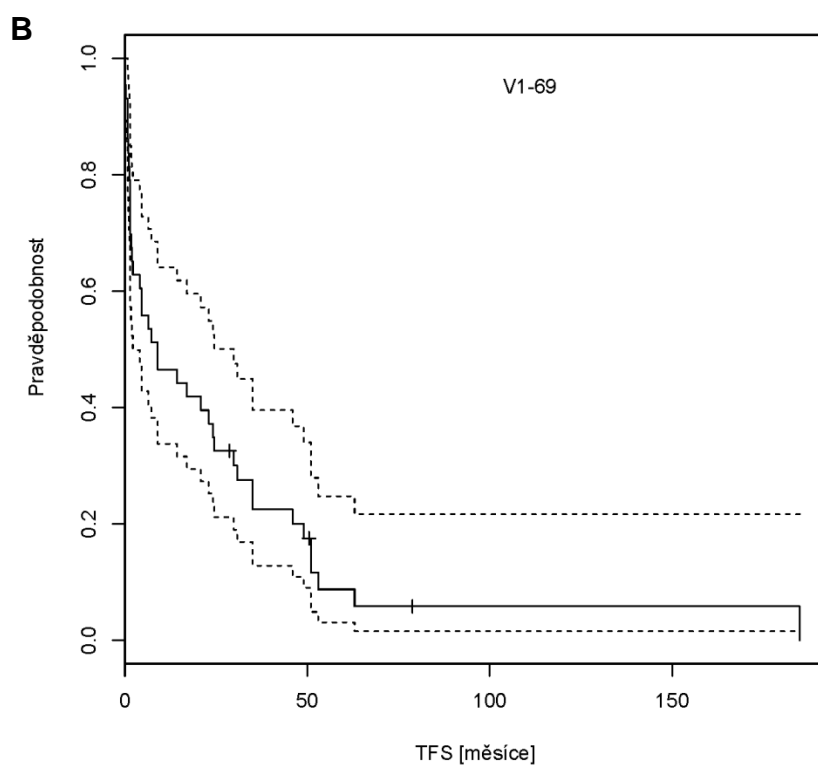
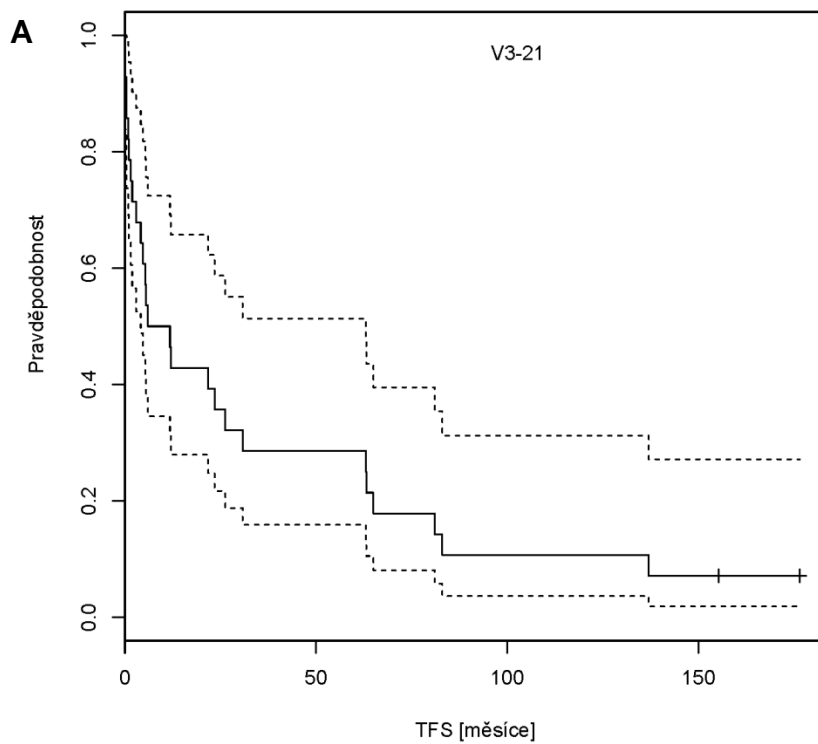
**Obrázek 28: Vliv delece 17p na OS nemocných s přítomností subgenu  
(A) *IGHV3-21* (B) *IGHV1-69***



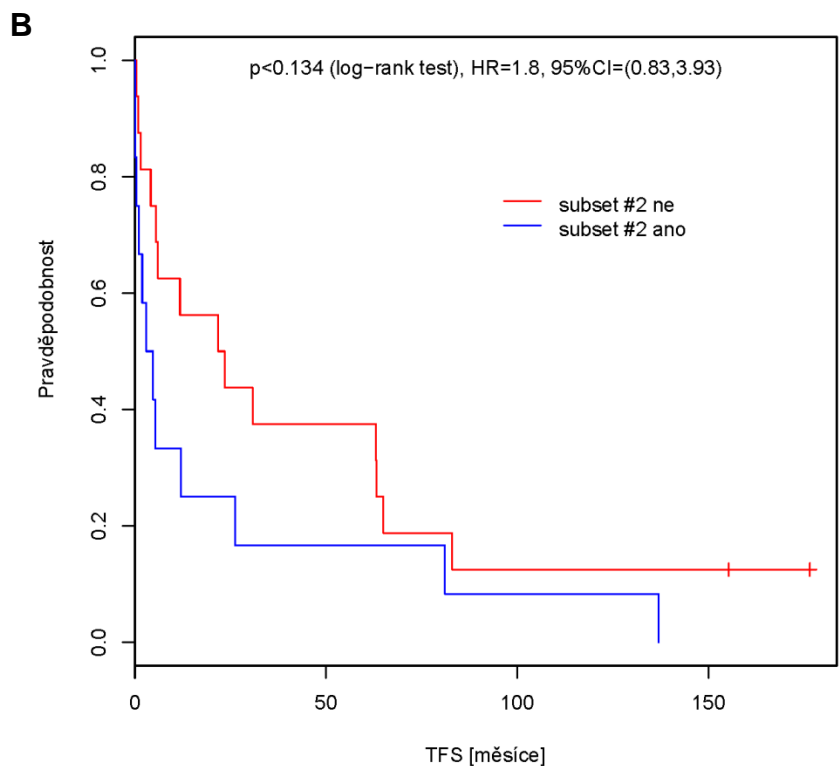
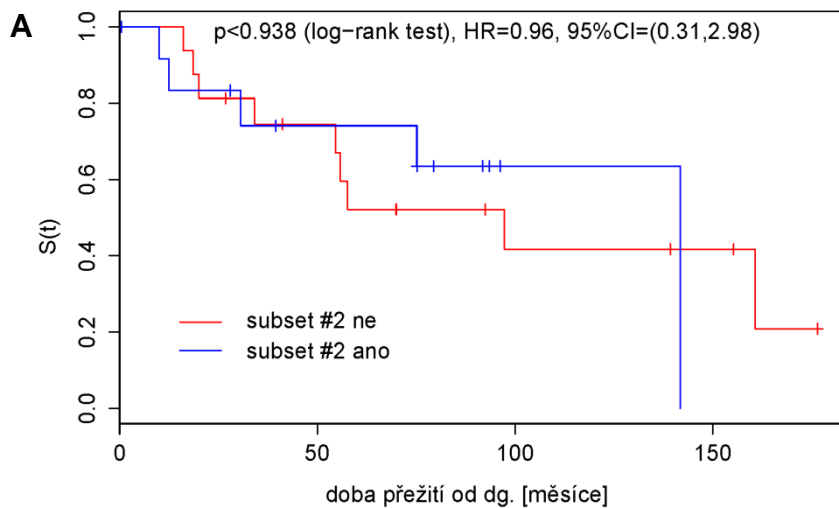
**Obrázek 29: Vliv delece 11q na OS nemocných s přítomností subgenu (A) IGHV3-21 (B) IGHV1-69.**



**Obrázek 30: TFS u nemocných s přítomností subgeny (A) *IGHV3-21*, (B) *IGHV1-69***



**Obrázek 31: Přítomnost stereotypního receptoru BCR subset #2 *IGHV3-21* a jeho: (A) vliv na OS, (B) vliv na TFS**



**Tabulka 14: Rekurentní aberace (FISH) u nemocných s přítomností *IGHV3-21***

CCA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Delece 17p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Delece 11q	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Trisomie 12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Delece 13q	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Delece 13q bialeická	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

CCA–komplexní cytogenetické aberace (3 a více klonálních aberací)

- subset # 2
- nepřítomnost rekurentních genetických aberací (FISH)
- přítomnost rekurentních genetických aberací (FISH)

Pozn. Tabulka zobrazuje pouze pacienty vyšetřené metodou FISH, u kterých byla nalezena rekurentní genetická aberace

**Tabulka 15: Srovnání výskytu rekurentních aberací u podsouborů nemocných s přítomností subgenů *IGHV3-21*, *IGHV1-69* a celého souboru nemocných**

	Subset #2 (N=13)	Non-subset #2 (N=16)	<i>IGHV3-21</i> (N=29)	<i>IGHV1-69</i> (N=51)	Celý soubor (N=417)
Delece 13q	9 (81 %)	7 (50 %)	16 (64 %)	21 (54 %)	169 (46 %)
Delece 11q	4 (31 %)	2 (18 %)	6 (25 %)	14 (35 %)	71 (19 %)
Trisomie 12	0 (0 %)	1 (7 %)	1 (8 %)	6 (14 %)	46 (12 %)
Delece 17p	0 (0 %)	3 (20 %)	3 (10 %)	3 (7 %)	29 (8 %)

### 7.3.8. Posouzení závislosti výpovědní hodnoty vybraných prognostických faktorů – Fisherův přesný test

K detailnější analýze síly a nezávislosti prognostické hodnoty sledovaných prognostických faktorů (nemutovaného stavu *IGHV*, přítomnosti subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69*) ve vztahu k ostatním prediktivním faktorům (věk > 65 let, počet lymfocytů > 50×10<sup>9</sup>/l, stádium Binet B, C, B2M > 2,34 mg/l, sTk > 9 U/l a delece 11q) byl použit Fisherův přesný test (Tabulka 16). Cílem bylo prokázat

zejména prognostickou závislost, respektive nezávislost vybraných prognostických faktorů.

Nezávislost byla prokázána mezi mutačním stavem *IGHV* a věkem a mezi mutačním stavem a subgenem *IGHV3-21*. Mezi ostatními faktory a mutačním stavem *IGHV* byla prokázána statistická závislost.

Fisherovým přesným testem byla dále prokázána prognostická nezávislost subgeneru *IGHV1-69* a věku > 65 let, subgeneru *IGHV1-69* a sTk > 9 U/l, ostatní faktory ve vztahu k *IGHV1-69* jsou závislé.

Prognostická nezávislost subgeneru *IGHV3-21* byla pozorována ke všem ostatním prognostickým faktorům, pouze ve vztahu ke stádiu onemocnění byla pozorována statisticky významná závislost.

**Tabulka 16: Srovnání podsouborů pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* a podsouborů s přítomností subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* pomocí Fisherova přesného testu**

	Nemutovaný <i>IGHV</i>	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHV3-21</i>
Věk > 65 let	p < 0,22	p < 0,45	p < 0,43
Lymfocyty > 50x10 <sup>9</sup> /l	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,10
Binet A vs B,C	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05
B2M (mg/l) > 2,34 mg/l	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,36
sTk > 9 U/l	p < 0,05	p < 0,1	p < 0,29
Delece 11q	p < 0,05	p < 0,05	p < 1
Nemutovaný/ mutovaný <i>IGHV</i>	-	p < 0,05	p < 0,17
<i>IGHV1-69</i>	p < 0,05	-	-
<i>IGHV3-21</i>	p < 0,17	-	-

### 7.3.9. Srovnání rizikových podskupin nemocných

V následující analýze byly dále vzájemně porovnány rizikové podskupiny definované na základě výše uvedeného statistického rozboru (pacienti s nemutovaným stavem *IGHV*, se subgenem *IGHV1-69* a *IGHV3-21*, s delecí 11q a delecí 17p). Jako skupina pro srovnání byl vzat celý soubor pacientů a podsoubor s mutovaným stavem *IGHV*. Srovnávanou hodnotou byly mediány hodnoty počtu lymfocytů, trombocytů a hodnota hemoglobinu, dále pak mediány hodnoty sérových markerů B2M a sTk.

Nejvyšší hodnota mediánu počtu lymfocytů byla zjištěna u pacientů s delecí 11q, naopak nízká hodnota byla zjištěna u pacientů s delecí 17p. Relativně vysoký medián počtu lymfocytů byl zjištěn u pacientů se subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69* (Graf 11).

U pacientů s delecí 17p byl zjištěn nejnižší medián hodnoty hemoglobinu, relativně nízký medián hodnoty hemoglobinu byl zjištěn také u pacientů se subgenem *IGHV3-21* (Graf 12). U pacientů s delecí 17p byl dále zjištěn nejnižší medián počtu trombocytů (Graf 13).

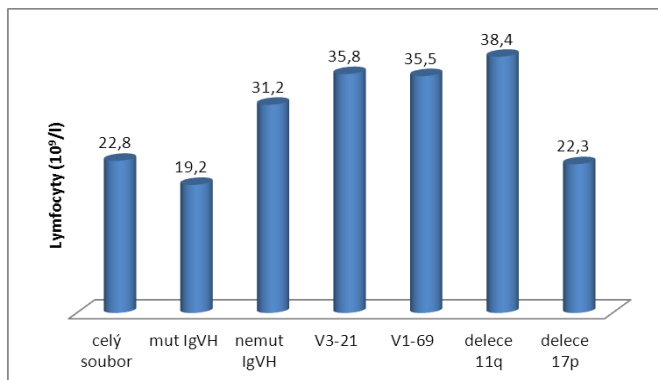
Nejvyšší mediány B2M byly zjištěny u pacientů s delecí 17p, vysoké hodnoty dále u pacientů se subgenem *IGHV3-21* a pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* (Graf 14). Stejně tak nejvyšší medián hodnoty sTk byl detekován u pacientů s delecí 17p, následován mediánem hodnoty sTK u pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* a subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69* (Graf 15).

Porovnali jsme zastoupení mužského pohlaví, kde je vyšší frekvence výskytu u podsouboru s přítomností *IGHV1-69* než u podsouboru *IGHV3-21* (Graf 16). Rozdíl nebyl prokázán jako statisticky významný.

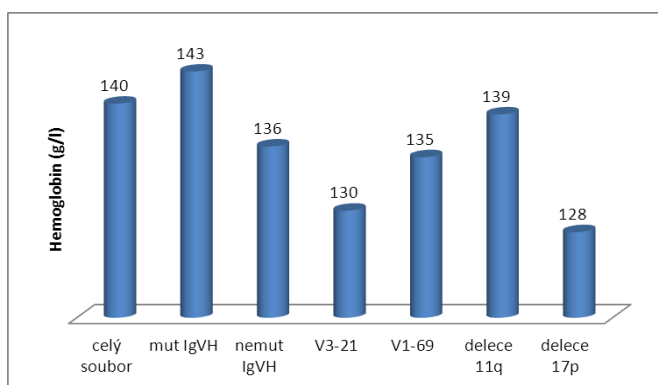
Dále jsme porovnali podsoubory nemocných s mutovaným a nemutovaným stavem *IGHV* ve výskytu rizikových změn delece 11q a delece 17p. Prokázali jsme vyšší výskyt delece 11q a delece 17p u nemocných s nemutovaným stavem *IGHV* (28,9 % a 5,9 %) oproti výskytu u pacientů s mutovaným stavem *IGHV* (10,6 % a 3,8 %). Chí-kvadrát test prokázal statistickou významnost rozdílu výskytu delece 11q ( $p < 0,001$ ) a delece 17p ( $p < 0,028$ ) u obou podsouborů.



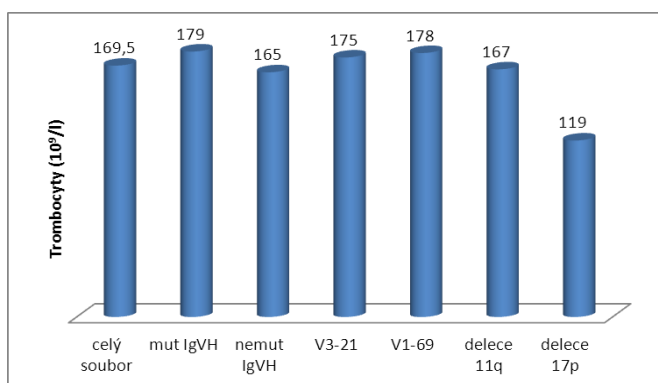
**Graf 11: Srovnání vybraných podskupin pacientů dle mediánu počtu lymfocytů v periferní krvi**



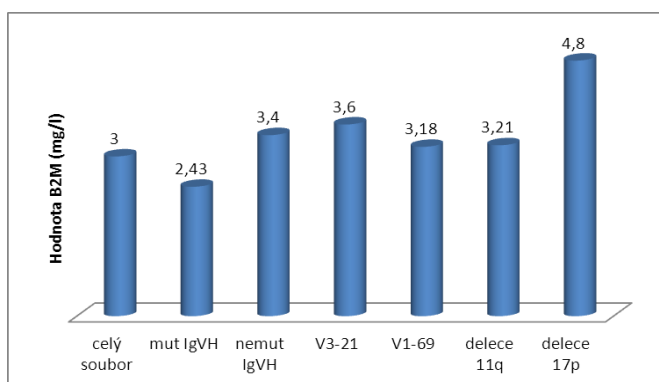
**Graf 12: Srovnání vybraných podskupin pacientů dle mediánu hodnoty hemoglobinu**



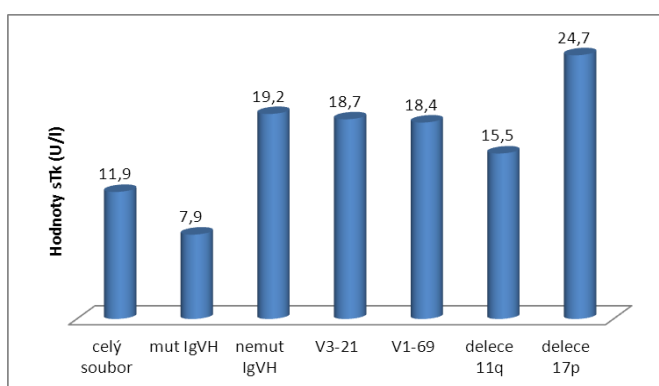
**Graf 13: Srovnání vybraných podskupin pacientů dle mediánu počtu trombocytů**



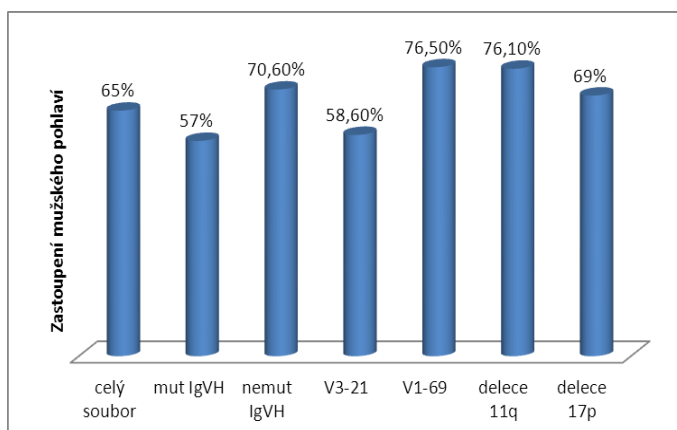
**Graf 14: Srovnání vybraných podskupin pacientů dle mediánu hodnoty B2M**



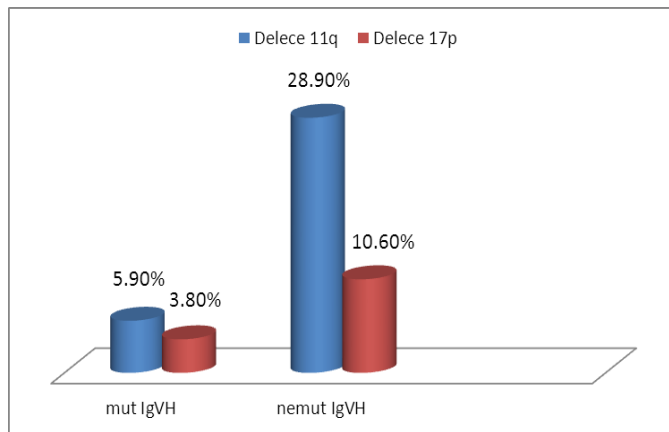
**Graf 15: Srovnání vybraných podskupin pacientů dle mediánu hodnoty sTk**



**Graf 16: Srovnání vybraných podskupin pacientů v poměrném zastoupení mužského pohlaví**



**Graf 17: Srovnání výskytu delece 11q a 17p u podskupin pacientů s mutovaným, nemutovaným stavem *IGHV***



## 8. Diskuze

### 8.1. Charakteristika souboru nemocných, analyzované prognostické faktory

Vyšetřování prognostických faktorů (klasických i nových biologických) včetně vyšetření cytogenetiky, FISH a mutačního stavu *IGHV* se věnujeme na HOK LF UP a FN Olomouc systematicky dlouhodobě. To nám umožnilo retrospektivně analyzovat prognostický význam standardně vyšetřovaných prognostických faktorů na rozsáhlém souboru 417 nemocných, kteří byli nově diagnostikováni v letech 2000–2011. Zařazování prvních nemocných do analýzy v roce 2000 se shoduje se zahájením vyšetřování mutačního stavu *IGHV*, jakožto zcela zásadního prognostického markeru, jehož znalost byla a je pro klinickou praxi důležitá. Prognostický význam faktorů byl prospektivně studován v době stanovení diagnózy onemocnění, i když aktuální doporučení ke stanovení individuální prognózy dle NCI směřuje k provádění těchto vyšetření až před zahájením léčby (1).

Do našeho souboru nebyli zařazeni všichni nově diagnostikovaní pacienti našeho spádového regionu v daném časovém období. Na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN Olomouc byli ze spolupracujících pracovišť odesláni pouze ti nemocní, u kterých se předpokládalo použití intenzivnější léčby, a tudíž u nich byla potřeba vyšetření kompletního panelu prognostických faktorů. Celá řada starších pacientů s nekomplikovaným průběhem onemocnění byla dispenzarizována a léčena regionálními hematology a naši péči nevyžadovala. Ve srovnání s tím nemocní z Olomouce a okolí byli do souboru zařazeni všichni, i ti v počátečních fázích choroby a v pokročilejším věku. Také u nich jsme vyšetřovali panel prognostických faktorů. Analyzovaný soubor tak podlehl určitému „selekčnímu tlaku“ danému mírou spolupráce odesílajících pracovišť našeho regionu. Data získaná na souboru pacientů HOK LF UP a FN Olomouc se pro tyto skutečnosti do určité míry liší od dat epidemiologických.

Medián věku nově diagnostikovaných pacientů byl 61 let, což je hodnota nižší než uváděný medián věku v epidemiologických studiích. Eichhorstová a kolektiv uvádí medián věku nemocných 72 let (11). Ve věku  $\leq 55$  let bylo v našem souboru diagnostikováno 25 % nemocných. Pro srovnání data uváděná literaturou hovoří o 10 % pacientů v této věkové skupině (11).

„Selekční tlak“ pochopitelně tak ovlivnil nejen věkové rozložení souboru, ale také zastoupení jednotlivých prognostických faktorů a následně logicky také OS a TFS nemocných.

Pacienti našeho souboru byli poměrně často diagnostikováni v pokročilém stádiu onemocnění Binet B a C (46 % všech pacientů souboru), v časném stádiu onemocnění Binet A bylo diagnostikováno 54 %. V posledních 15 letech je uváděno zastoupení stádia onemocnění Binet A v době diagnózy kolem 70 % (86). Taktéž bylo v našem souboru lehce vyšší zastoupení pacientů s nemutovaným stavem *IGHV*. Tito pacienti tvořili 58 % celého souboru, přičemž literární údaje opakovaně uvádí 50 % pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* (27, 37).

Pokud jsme analyzovali zastoupení rizikových cytogenetických změn, pak jsme pozorovali lehce vyšší zastoupení pacientů s delecí 17p oproti klasické práci Döhnera a kolektivu (7,7 % vs 7 %), lehce vyšší zastoupení delecce 11q (19,2 % vs 18 %), pacientů s delecí 13q bylo v našem souboru nalezeno naopak méně (46,2 % vs 55 %) (47).

Pro diagnostiku genetických změn byl využit nejlépe dostupný materiál – periferní krev. Tento fakt vycházel z mezinárodních doporučení, zvyklostí pracoviště a nepochybně také z faktu, že ne všichni nemocní jsou odběru kostní dřeně zcela nakloněni. Vzhledem k tomu, že nebyla u všech nemocných prováděna také biopsie kostní dřeně k posouzení typu infiltrace kostní dřeně, nebyl tento prognostický faktor do analýzy zařazen.

Z tabulek lze rovněž vysledovat, že ne všichni nemocní měli vyšetřenu kompletní sadu prognostických faktorů. Absolutní většina, 410 pacientů mělo vyšetřený a jednoznačně určený mutační stav *IGHV*, kompletní FISH analýza mohla být provedena u 366 pacientů, také v případě sérových prognostických faktorů máme data od většiny, 350 vyšetřených. S ohledem na později zavedenou metodiku stanovení ZAP-70 byly dostupné hodnoty analyzovány pouze u 175 nemocných.

## 8.2. Charakteristika nemocných se subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69*

### 8.2.1. Subgen *IGHV3-21*

Z řady studií vyplývá, že zastoupení jednotlivých rodin VH genů není u CLL rovnoměrné. Některé subgeny se vyskytují významně častěji, a to právě rodiny genů VH1 a VH3 (49, 114).

V našem souboru nemocných byla nejčastěji zastoupena rodina genů VH3, a to v 50 % a rodina VH1, a to v 25,9 % souboru.

Subgen *IGHV3-21* byl zastoupen ve 14 % z celé rodiny VH3 genů a subgen *IGHV1-69* byl zastoupen v celých 47,2 % VH1 rodiny genů.

Jedním z hlavních cílů naší práce bylo podrobně popsat skupinu nemocných právě s přítomností těchto dvou subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69*. Subgen *IGHV1-69* byl přítomen celkem u 51 pacientů celého souboru, což představuje 12,2 % všech našich nemocných a *IGHV3-21* subgen byl přítomen u 29 pacientů celého souboru, čili u 7 % všech našich nemocných.

Zastoupení *IGHV3-21* subgenu v našem souboru (7 %) bylo nižší než je výskyt uváděný Tobinem a kolektivem autorů z roku 2002 ze skandinávských zemí (10–13 %), ale lehce vyšší než v zemích jižní Evropy a v USA (3–4 %) (48, 119, 196). Poslední práce autorů Cahill a kolektiv revidovala výskyt *IGHV3-21* u nemocných ze Švédska a uvádí výskyt 6,5 %. Tato práce tak zpochybnila původní pozorování vysokého výskytu subgenu *IGHV3-21* ve skandinávských zemích. Vyšší zastoupení vysvětlili autoři „selektovaným“ souborem nemocných z původní studie Tobina a kolektivu (120).

Rozdílné zastoupení subgenu *IGHV3-21* v různých studiích je vysvětlováno pochopitelně různě. Od role „selektivního“ tlaku v jednotlivých souborech přes podíl vlivu prostředí a expozici určitým antigenům (53).

V roce 2006 byla Kröberem publikována jedna z prvních prací zabývající se podskupinou nemocných se subgenem *IGHV3-21*. Autor v ní na souboru 148 nemocných (z toho 16 se subgenem *IGHV3-21*) dával do vzájemného vztahu mutační stav *IGHV* a pozitivitu ZAP-70. Zatímco u všech nemocných souboru významně převažovala konkordance (shoda) positivity ZAP-70 a nemutovaného stavu *IGHV* a shoda negativity ZAP-70 a mutovaného stavu *IGHV*, u nemocných se subgenem *IGHV3-21* byla popsána v 9 případech neshoda (diskordance). Nemocní v 8 případech měli mutovaný stav *IGHV*, ale

současně pozitivitu ZAP-70. Tito nemocní s mutovaným stavem měli vysoký stupeň homologie s genem germinální linie (v rozmezí 96,4–97,6 %). Ve stejné práci autoři provedli multivariantní regresní analýzu ve vztahu k TFS, do které zařadili také *IGHV3-21*. Přítomnost tohoto subgenu (vedle nemutovaného stavu, rizikových genetických změn a ZAP-70 positivity) byla prokázána jako nezávislý faktor ve vztahu k TFS (118).

U nemocných s *IGHV3-21* se často vyskytuje mutovaný stav *IGHV*, ale OS těchto nemocných je stejné jako OS nemocných s nemutovaným stavem *IGHV* (38, 48, 120).

Ve světovém písemnictví se subgenu *IGHV3-21* stále věnuje řada autorů. V souvislosti s jeho prognostickým významem byl podrobně zkoumán stereotypní BCR receptor (subset #2), některými autory označovaný jako motif-1 (197). A právě přítomnost stereotypního receptoru u *IGHV3-21* je spojována s agresivnějším průběhem onemocnění. Stamatopoulos ve své práci z roku 2007 u nemocných se subset #2 *IGHV3-21* popisuje častější klinickou progresi onemocnění a častější úmrtí v souvislosti s klinickou aktivitou onemocnění. Neprokázal ale rozdílné OS mezi oběma podskupinami s a bez stereotypního receptoru (52). Přesto je právě tato práce nejčastěji citována v souvislosti s nepříznivou prognózou nemocných s přítomností subsetu #2.

Práce z USA z roku 2008 kolektivu autorů kolem Emanuely Ghia referuje svoje pozorování souboru 2457 nemocných, z nichž 63 nemocných neslo v genomu nádorových buněk subgen *IGHV3-21*. Autoři sice připouštějí podíl vlivu antigenní stimulace a postgerminální selekce na vysoce rizikovém onemocnění u těchto pacientů, ale nepříznivou prognózu této skupiny vztahují spíše k vysokému procentu homologie s genem germinální linie těchto nemocných s mutovaným stavem *IGHV3-21*, která je > 97 %. Pro srovnání průměrná homologie uváděná v literatuře u nemocných s mutovaným stavem *IGHV* bez subgenu *IGHV3-21* je < 94 %. V našem souboru pacientů s *IGHV3-21* s mutovaným stavem jsme ve shodě s uvedenými pozorováními popsali medián počtu mutací 3,4 % (rozmezí 2,1-6,6 %). Sledovanou veličinou v práci Ghia a kolektivu byl TFS, kde byl prokázán statisticky významný rozdíl u nemocných s mutovaným stavem *IGHV* a nemocných s mutovaným stavem s *IGHV3-21*. Přitom autoři neprokázali rozdíl v TFS v závislosti na přítomnosti stereotypního receptoru (subset #2), v jejich práci označovaného jako motif-1 (197).

Obdobný medián počtu mutací uvádí také Thorsélius a kolektiv v mezinárodní studii z roku 2006. Již název práce obsahuje hlavní pozorování autorů: „Nápadná homologie imunoglobulinových genů a špatná prognóza nemocných s *IGHV3-21* nezávislá na mutačním stavu a geografickém výskytu (119). Do studie bylo zařazeno 90 nemocných z Evropy, Austrálie a USA s mediánem počtu mutací *IGHV* 3,1 %. Práce také zmapovala výskyt vysoce homologní HCDR3 a neprokázala rozdíl v OS proti nemocným bez této homologie.

Recentní práce z roku 2012 autorů Cahil a kolektiv srovnává OS souboru 22 nemocných s *IGHV3-21*. Autoři neprokázali rozdíl v OS v závislosti na přítomnosti stereotypního receptoru subset #2 (120).

V naší práci jsme nepozorovali rozdíl v OS nemocných se subgenem *IGHV3-21* v závislosti na přítomnosti stereotypního receptoru subset #2. Stejně tak jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl v TFS těchto nemocných, i když určitou tendenci ke kratšímu TFS u subset #2 lze na Kaplan-Maierově křivce pozorovat.

Cahill a kolektiv švédských autorů v již zmíněné práci srovnali z literatury dostupná data o podílu zastoupení stereotypního receptoru subset #2 u *IGHV3-21* v různých částech světa. Zajímavé je zjištění jeho přibližně stejného zastoupení v Itálii, USA, Švédsku a středomořských oblastech. Všude je uváděný výskyt 40–55 % (52, 196, 197). Sami popisujeme 45 % zastoupení subsetu #2 v rámci *IGHV3-21*.

Z tohoto svého pozorování autoři logicky vyvodili, že vliv specifické antigenní stimulace na leukemogenezi nemusí být tak jednoznačný, jak se soudilo z prvních prací Tobina a kolektivu.

### 8.2.2. Subgen *IGHV1-69*

Pro další analýzu jsme v naší práci vybrali podsoubor pacientů se subgenem *IGHV1-69*. Přítomnost *IGHV1-69* dle literatury znamená pro pacienta horší prognózu (126, 127). Celkem 98 % našich pacientů s *IGHV1-69* mělo nemutovaný stav *IGHV*, což odpovídá publikovaným datům a faktu, že k mutacím nedochází v rámci V rodin uniformně (48, 126, 127). Zastoupení téměř výhradně nemutovaného stavu *IGHV* v podsouboru *IGHV1-69* tak zásadním způsobem určuje prognózu pacientů.



Panovska-Stavridis a kolektiv ve své práci z roku 2007 referují soubor 25 nemocných s *IGHV1-69*, z nichž 22 nemocných mělo nemutovaný stav *IGHV*. V mediánu sledování 56 měsíců 80 % nemocných vyžadovalo léčbu (vs 82 % našeho souboru při mediánu sledování 51 měsíců), 96 % nemocných souboru v průběhu sledování zemřelo (vs 55 % úmrtí v našem souboru). Jak zdokumentujeme v další části diskuze také s ohledem na TFS a délku OS se jevil soubor nemocných oproti našemu podsouboru rizikovější (126).

Orlandi a kolektiv v roce 2009 popsali soubor 46 nemocných s přítomností *IGHV1-69* a navíc ve srovnání s předchozí prací zohlednili při statistických analýzách vysoké (87 %) zastoupení nemocných s nemutovaným stavem *IGHV* a srovnání proto provedli nejen k ostatním nemocným bez subgenu *IGHV1-69*, ale také k nemutovaným nemocným bez subgenu *IGHV1-69*. Tím autorka vyloučila závislost pozorování na rizikovosti nemutovaného stavu *IGHV*. Po této korekci již nebylo pozorováno vyšší zastoupení rizikových cytogenetických změn delece 11q a 17p. Autoři tedy uzavírají, že nemutovaný stav *IGHV* má větší vliv na OS nemocných než přítomnost *IGHV1-69*. Autoři uvádějí nutnost zahájení léčby u 68 % nemocných ve stádium Binet A a B, v našem souboru to bylo ve všech stádiích nemoci 82 %. Dále autoři uvádějí 26 % zastoupení nemocných se stereotypním receptorem. Výsledky OS a TFS budeme rozebírat v další kapitole diskuze (127). Autoři ani jedné z výše uvedených prací nekomentují typ podávané léčby a léčebné odpovědi.

Stamatopoulos se spolupracovníky u nemocných s *IGHV1-69* popisuje 38 % zastoupení stereotypních receptorů s osmi různými subsety (subsety #3, 5, 6, 7, 9, 15, 19, 27) a uvádí různou prognózu v rámci subsetů (52). Zastoupení stereotypních receptorů u *IGHV1-69* je tedy nižší než u nemocných s *IGHV3-21*, kde se uvádí zhruba 50 %. Navíc je zde značná různorodost v subsetech, oproti jednoznačně preferenčnímu zastoupení subsetu #2 u *IGHV3-21*. Sami jsme v naší práci bližší analýzu stereotypních receptorů u *IGHV1-69* neprováděli.

### 8.3. Univariantní a multivariantní analýza studovaných prognostických faktorů ve vztahu k OS

Základním kamenem statistického rozboru ve všech klinických studiích je univariantní a multivariantní analýza jednotlivých faktorů, které mají význam pro OS nemocných, případně pro progresi onemocnění. Předložená práce přináší modelování OS pomocí univariantního a multivariantního Coxova regresního modelu proporcionálního rizika, pomocí něhož je odhadována prognostická síla jednotlivých parametrů.

Primárně zvolenou sledovanou veličinou, k níž byl vztahován význam prognostických faktorů, bylo OS. Medián OS nemocných souboru byl 116 měsíců (rozmezí 100–131 měsíců). Medián sledování souboru 417 nemocných byl 50,7 měsíců (rozmezí 0,26–280 měsíců).

Zcela ve shodě s literaturou jsme v univariantní analýze prokázali prognostický význam následujících faktorů ve vztahu k OS: věku > 65 let, počtu lymfocytů (>  $30 \times 10^9/l$ ), klinického stádia onemocnění Binet B a C, sérových prognostických faktorů B2M a sTk, nemutovaného stavu *IGHV* a delece 17p a 11q (21, 37, 47, 94, 97, 103, 105).

Naopak jsme neprokázali nepříznivý prognostický význam mužského pohlaví. V souvislosti s nepříznivou prognostickou rolí mužského pohlaví pro OS pacientů s CLL je nejčastěji citována práce Catovsky z roku 1989 (91). Vysvětlením kratšího OS mužů s CLL může být obecně jejich kratší průměrná délka přežití v populaci. U CLL jako chronického onemocnění, které se vyskytuje s mediánem věku nad 60 let, může hrát tento fakt nezanedbatelnou roli (92). Recentní práce z roku 2014 pracující na prognostickém indexu autorů Bahlo a kolektivu na souboru 2000 pacientů prokazují nepříznivý prognostický význam mužského pohlaví ve vztahu k OS, ale práce pracující na validaci těchto dat z Mayo kliniky (soubor 680 pacientů) naopak nepotvrzuje význam mužského pohlaví ve vztahu k OS (93).

Neprokázali jsme nepříznivý prognostický význam stanovení positivity ZAP-70 a CD38 ve vztahu k OS. Recentní práce z roku 2014 vycházející z výsledků GCLL SG autorů Bahlo a kolektiv v univariantní analýze bezmála 2000 pacientů také nepotvrdily ZAP-70 a CD38 jako statisticky významné prognostické faktory ve vztahu k OS (93). Na základě literárních údajů,

vlastních výsledků a aktuálních doporučení NCCI a IWCLL jsme v praxi taktéž od stanovení ZAP-70 a CD38 jako markeru prognózy ustoupili (1, 112).

Do multivariantní analýzy pravděpodobnosti OS vstupovaly statisticky významné faktory, které určila analýza univariantní. V multivariantní analýze celého souboru pacientů jsme prokázali nepříznivý prognostický význam stanovení věku > 65 let, nemutovaného stavu *IGHV*, delece 17p a počtu lymfocytů > 50 x 10<sup>9</sup>/l. Tento výsledek je logickým důkazem síly prognostického významu těchto faktorů a je ve shodě s publikovanými daty (102).

Zcela zásadní pro prognózu pacienta má stanovení mutačního stavu, což dokládají rozdílné mediány OS mezi oběma podskupinami.

Medián OS pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* byl v našem souboru 86 měsíců, medián OS pacientů s mutovaným stavem *IGHV* byl statisticky významně delší, a to 206 měsíců. Rozdílné výsledky uváděných mediánů OS jsou vždy podstatně ovlivněny charakterem studované populace nemocných. Studie prováděná na „selektovaném“ souboru nemocných v práci Tobina a kolektivu z roku 2002 referuje medián OS u nemocných s nemutovaným stavem *IGHV* 70 měsíců a u nemocných s mutovaným stavem 146 měsíců (48). Hamblin a kolektiv pro pacienty s nemutovaným stavem *IGHV* uvádí medián OS 117 měsíců a pro pacienty s mutovaným stavem *IGHV* 293 měsíců (27). Jiná práce španělských autorů González-Gascón y Marín a kolektiv na „neselektovaném“ souboru nemocných prokázali medián OS nemocných s mutovaným stavem *IGHV* 215 měsíců a nemocných s nemutovaným stavem *IGHV* 117 měsíců (198). Mediány OS pacientů s mutovaným a nemutovaným stavem *IGHV* v některých publikovaných reprezentativních světových studiích jsou lehce vyšší než je naše pozorování. Kratší mediány OS našich nemocných podobně jako v práci Tobina a kolektivu jsou dány „selekcí“ nemocných v souborech v tzv. univerzitních centrech. Všechny práce bez ohledu na charakter studovaných souborů ale potvrdily statisticky významné rozdíly v OS v závislosti na mutačním stavu *IGHV*.

V multivariantní analýze nebyl (na rozdíl od analýzy univariantní) prokázán význam stanovení stádia Binet (testováno Binet B a C vs Binet A) pro prognózu pacienta. Stejně tak nebyl prokázán význam stádia, pokud jsme testovali stádium Binet A vs Binet B vs Binet C.

Stádium onemocnění není veličina měřitelná, její objektivizace je obtížná. Klinické vyšetření v kombinaci se stanovením poklesu hodnoty hemoglobinu a počtu trombocytů při stanovení stádia nemoci nám přináší omezenou informaci o prognóze, což byl nepochybně důvod, který historicky vedl ke snaze zpřesnit prognózu hledáním dalších prognostických faktorů.

Na základě níže uvedené hlubší rozvahy nad prognostickými indexy, ať už těmi využívajícími zejména klasické faktory nebo nad novými klinicko-biologickými indexy, lze naznačit postavení významu stanovení klinického stádia nemoci.

Lze říci, že od roku 2007, kdy byl poprvé publikován Wierdou a kolektivem z M.D. Anderson Cancer Center prognostický index k predikci OS dosud neléčených nemocných, prokázaly nad vší pochybnost úspěšné validace na odlišných velkých souborech tisíců nemocných z celého světa jeho platnost. Index zahrnuje faktory: věk, hodnotu B2M, absolutní počet lymfocytů, pohlaví, stádium onemocnění dle Raie (0-II vs III-IV) a počet postižených skupin lymfatických uzlin. Podle počtu dosažených bodů byli nemocní rozděleni do 3 rizikových skupin s predikcí různé délky OS, tj. do nízkého, středního a vysokého rizika. Nejvyšší bodové hodnocení v indexu dosahovaly měřitelné B2M a počet lymfocytů, stádium onemocnění III-IV dle Raie a minimálně 3 postižené skupiny uzlin měly v indexu nižší bodové ohodnocení, čili menší váhu pro stanovení rizikovosti pacienta (Tabulka 4) (100).

Bulian a kolektiv na souboru 1000 pacientů z několika italských center ověřil platnost indexu navrženého Wierdou a použil zjednodušený index, kde z původních šesti faktorů použil faktory čtyři (věk, pohlaví, stádium Binet a hodnotu B2M) k predikci OS a TFS (199).

Je až s podivem, že v době možnosti stanovování nových biologických prognostických faktorů zůstává prognostický index u roku 2007 stále středem vědeckého zájmu. Dokládá to práce publikovaná v červnu roku 2014 skupinou italských autorů Gentile a kolektiv, která na souboru 1500 nemocných potvrzuje platnost tohoto prognostického indexu k predikci doby do zahájení terapie všech pacientů, ale i u nemocných ve stádiu Rai 0 a nově u monoklonální B lymfocytózy (200). Je dobré si uvědomit, že při pečlivém vyšetření nemocného můžeme využít možnosti jednoduché a rychlé predikce prognózy u nemocných i bez dalších náročných a často nákladných vyšetření.

V roce 2011 stejný autorský kolektiv Wierda a spolupracovníci zařadili do dalšího indexu k predikci intervalu do zahájení léčby nové, biologické prognostické faktory – stanovení mutačního stavu a výsledky cytogenetického vyšetření (přítomnost delece 11q a delece 17p) (101).

Bulian a spolupracovníci v roce 2012 nazvali svůj index jako klinicko-biologický. Vyšel z výsledků multivariantní analýzy a do indexu také zařadili stanovení mutačního stavu *IGHV*, stanovení delece 17p a 11q, stanovení ZAP-70 a dále klasické prognostické faktory. Výsledkem statistických analýz bylo bodové přiřazení jednotlivým prognostickým faktorům. Stádium Binet C bylo v indexu rizika pro OS ohodnoceno 3 body, stádium Binet B dvěma body, nemutovaný stav *IGHV*, delece 17p, B2M a věk nad 65 let bodem jedním (102).

Náš výsledek multivariantní analýzy, který neprokazuje nepříznivý prognostický význam stanovení stádia Binet B a Binet C (přes průkaz významu v analýze univariantní) nás nutí zamyslet se také nad možnými nepřesnostmi, kterými může být stanovení stádia nemoci zatíženo.

Všeobecně se v literatuře uvádí, že nové biologické prognostické faktory hrají podstatnou roli u podskupiny pacientů v časných stádiích onemocnění, kdy nám pomáhají predikovat další vývoj nemoci. Van Bockstaele a kolektiv ve své práci z roku 2008 ale konstatovali, že z celkového počtu 19 studií, které například hodnotily význam stanovení mutačního stavu *IGHV*, pouze 6 prací provedlo stejnou analýzu pro časná stádia nemoci (201).

Sami jsme u podskupiny pacientů ve stádiu Binet A provedli multivariantní analýzu ostatních studovaných prognostických faktorů ve vztahu k OS, do analýzy vstupovaly všechny faktory použité v multivariantní analýze celého souboru. Prokázali jsme nepříznivý prognostický význam věku > 65 let a nemutovaného stavu *IGHV*. Dále byl prokázán nepříznivý prognostický význam přítomnosti subgenu *IGHV3-21* pro OS těchto pacientů. Ke stejnému výsledku prokázanému multivariantní analýzou již na celém souboru nemocných dospěl ve své práci také Kröber (118).

V roce 1991 Molica srovnával nemocné ve stádiu Binet A bez progresse nemoci s nemocnými ve stádiu Binet A s progresí choroby. Prokázal u nich statisticky významně rozdílné hodnoty hemoglobinu, počtu lymfocytů, rozdílný LDT, rozdílné zastoupení difuzního postižení kostní dřeně, rozdíl v zastoupení stádií Rai 0,I oproti stádiu Rai II a také rozdílnou pravděpodobnost úmrtí v

souvislosti s CLL (202). Stejný autor potom o bezmála 20 let později v roce 2010 využil prognostický index a ověřil jeho platnost i pro časná stádia onemocnění Binet A (203). Bulian a kolektiv v roce 2012 ověřil platnost biologicko-klinického indexu pro stádium Binet A. Prokázal statisticky významný rozdíl v době do zahájení léčby pro nemocné se zvýšením B2M, nemutovaným stavem IGHV a s delecí 11q (102).

Vzhledem k tomu, že naše práce přináší poměrně ucelený souhrn prognostických faktorů v souboru více než 400 pacientů, zvažovali jsme možnost ověřit platnost publikovaných prognostických indexů, nového prognostického indexu i klinicko-biologického indexu (100, 101, 172). Počet našich nemocných a frekvence kompletních pozorování (událostí) se však z našeho pohledu i z pohledu statistika jeví pro ověření platnosti indexu nízké. Proto jsme od původně zamýšlené snahy prozatím ustoupili.

#### 8.4. Subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69* – univariantní a multivariantní analýza OS a TFS

V předkládané práci jsme potvrdili pozorování dalších autorů, že pacienti *IGHV3-21* našeho souboru s mutovaným *IGHV* mají v univariantní analýze stejné OS jako všichni ostatní pacienti souboru s nemutovaným stavem *IGHV*. Stejně tak se neliší OS u našich nemocných s *IGHV3-21* v závislosti na mutačním stavu (38, 48, 119). Současně jsme ale v univariantní analýze neprokázali významný rozdíl v OS nemocných v podsouboru bez přítomnosti subgenu *IGHV3-21* a nemocných s jeho přítomností.

Medián OS našeho souboru pacientů *IGHV3-21* byl 97 měsíců (rozmezí: 55–nedosažen). Tobin a kolektiv uvádí ve své práci z roku 2003 medián OS nemocných s *IGHV3-21* 83 měsíců. Medián OS pacientů našeho souboru s nemutovaným stavem *IGHV* byl 86 měsíců, Tobin a kolektiv referují medián 70 měsíců (48).

TFS byl u nemocných se subgenem *IGHV3-21* 9 měsíců (rozmezí: 4–63 měsíců). Toto zjištění stejně jako fakt, že byla léčena velká část nemocných, svědčí o agresivním průběhu nemoci pacientů s výskytem *IGHV3-21* subgenu. Cahill a kolektiv v práci z roku 2012 na souboru 22 nemocných s *IGHV3-21* referuje při OS 83 měsíců TFS 19 měsíců, s tím, že u 82 % pacientů bylo nutno zahájit terapii (120). V průběhu sledování našeho souboru nemocných s *IGHV3-21* bylo nutno zahájit léčbu u 90 % nemocných. Celkový počet léčebných odpovědí v případě nemocných se subgenem *IGHV3-21* byl 67 %. Sami jsme tedy v porovnání s literaturou pozorovali kratší TFS nemocných s *IGHV3-21*. Nicméně poměrně široce definovaný pojem aktivity onemocnění dle NCI-WG u nemocných s CLL připouští možnost značného, subjektivně podmíněného časového rozptylu při jejím zahájení (1).

OS pacientů se subgenem *IGHV1-69* bylo v univariantní analýze významně kratší oproti pacientům non-*IGHV1-69*, což pravděpodobně souvisí s predilekčním zastoupením pacientů v nemutovaném stavu *IGHV*. Medián OS našich pacientů s *IGHV1-69* byl 85 měsíců (rozmezí: 61–128) a TFS byl 9 měsíců (rozmezí: 2–30 měsíců).

Panovska-Stavridis uvádí medián OS nemocných s *IGHV1-69* 56 měsíců při mediánu OS ostatních nemocných s nemutovaným stavem *IGHV* 60 měsíců

a mediánu OS nemocných s mutovaným stavem *IGHV* 125 měsíců. TFS uvádějí autoři 1 měsíc u nemocných s *IGHV1-69* oproti 9 měsícům u ostatních s nemutovaným stavem *IGHV*. Pozorování uzavírají tak, že OS nemocných s *IGHV1-69* není horší než OS nemocných s nemutovaným stavem *IGHV* (126).

Orlandi a kolektiv uvádí TFS celého souboru s *IGHV1-69* 29 měsíců. Pokud srovnal pouze nemocné s *IGHV1-69* s nemutovaným stavem s ostatními non *IGHV1-69* s nemutovaným stavem, pak nebyl rozdíl statisticky významný (26 vs 37 měsíců). Další analýzy byly prováděny po vyloučení stádia nemoci Binet C, která ovlivňuje indikaci k zahájení léčby, ale ani v tomto případě nebyl rozdíl významný. Dále autor srovnával případný vliv stereotypních receptorů na TFS, ale nebyl mezi podskupinami s a bez stereotypních receptorů prokázán rozdíl (127).

Univariatní analýza našeho souboru nemocných s *IGHV3-21* a s *IGHV1-69* neprokázala statisticky významný rozdíl v OS v obou podskupinách. Podporu v podobném pozorování jsme v literatuře nedohledali.

Multivariatní analýza celého souboru našich pacientů neprokázala nezávislý prognostický význam výskytu subgenu *IGHV3-21* na OS pacientů. Pokud však byla tato analýza provedena u pacientů ve stádiu Binet A, pak prognostický význam výskytu *IGHV3-21* ve vztahu k OS byl jednoznačně potvrzen. Ani v tomto případě jsme v literatuře nedohledali analogickou analýzu až na pozorování Kröbera, který prokázal *IGHV3-21* jako rizikový faktor OS v multivariatní analýze na celém souboru nemocných (118).

### **8.5. Heterogenita podsouboru se subgenem *IGHV3-21* a homogenita podsouboru se subgenem *IGHV1-69***

V literatuře je mnohými autory popsána různá prognóza a odlišné OS v rámci podskupiny pacientů s *IGHV3-21* (52, 119, 123). Domníváme se, že naše subanalýza, která se týkala výpovědní hodnoty ostatních nepříznivých prognostických faktorů u pacientů s přítomností subgenu *IGHV3-21* (tj. věk > 65 let, počet lymfocytů >  $50 \times 10^9/l$  a delece 17p) dokládá v literatuře popisovanou biologickou a klinickou heterogenitu souboru. Jinak řečeno v rámci podsouboru nemocných se subgenem *IGHV3-21* je interindividuální variabilita biologického chování nemoci, která se odráží v přetrvávání výpovědní hodnoty ostatních



prognostických faktorů, v tomto případě delece 17p a počtu lymfocytů v periferní krvi.

U pacientů s přítomností *IGHV1-69* jsme naopak neprokázali ovlivnění OS přítomností dalších nepříznivých prognostických faktorů s výjimkou, kterou byl výskyt delece 17p. To dokládá poměrně silnou homogenitu skupiny, nepochybně danou téměř výhradním zastoupením pacientů s nemutovanými *IGHV* a zároveň odpovídá publikovaným datům, ze kterých je patrné, že delece 17p významně zhoršuje prognózu i u pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* (131, 132). Na rozdíl od těchto publikovaných dat nebyl v podsouborech *IGHV3-21* a *IGHV1-69* pozorován rozdíl v OS u pacientů v závislosti na přítomnosti delece 11q.

#### 8.6. Rekurentní cytogenetické aberace u subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* a u stereotypního BCR (subset #2)

U části nemocných s CLL se vyskytují některé povrchové BCR receptory opakovaně a jsou označovány jako stereotypní. Jejich existence svědčí pro roli určitého antigenu v leukemogenezi nemoci (38, 115, 116). Dosud je definováno více než 200 subsetů se stereotypní strukturou BCR, velkou část z nich tvoří 8 hlavních subsetů (subsetsy #1–8) (122).

Mutační stav *IGHV* definuje dvě hlavní klinické a biologické podskupiny onemocnění, přítomnost nebo absence stereotypních BCR ale nemá stejné postavení (125).

Přesto v posledních letech mnohé práce studovaly preferenční spojení stereotypních BCR a některých genetických změn (123, 204). Přitom pouze některé stereotypní BCR predikují vývoj genetických a molekulárních změn, které následně ovlivňují průběh onemocnění. Jedním z takových stereotypních BCR receptorů je subset #2 pacientů s *IGHV3-21* (119, 123, 125, 196).

V našem souboru nemocných se subset #2 jsme našli vysoký výskyt delece 11q (31 %), vysoký výskyt delece 13q (81 %) ve srovnání s výskytem u non-subset #2 (delece 11q v 18 %, delece 13q v 50 %) a výskytem u celého souboru pacientů (delece 11q v 19 % a delece 13q v 46 %). Žádný ze 3 pacientů se subgenem *IGHV3-21* a delecí 17p neměl přítomen subset #2. Stejně tak žádný nemocný se subset #2 neměl trisomii 12. Statistická analýza nebyla pro malý počet pozorování provedena. Naše výsledky jsme proto pouze

porovnali s pozorováním jiných autorů. Naše závěry se shodují s výsledky dalších autorů.

Marincevic a kolektiv v roce 2010 porovnali podsoubory nemocných *IGHV3-21* se subset #2, nemocné *IGHV4-34* se subset #4 a subset #16, nemocné bez těchto stereotypních receptorů a celý soubor nemocných z pohledu výskytu rekurentních genetických aberací. Práce naznačila vyšší zastoupení rekurentních aberací u nemocných se subset #2, zejména delece 13q a vyšší výskyt delece 11q oproti nemocným se stereotypními receptory subset #4 a subset #6. U těchto nemocných bez rekurentních aberací byl popsán pozvolný průběh onemocnění (123).

Práci s podobnou problematikou publikoval v roce 2013 Rossi a kolektiv. Na souboru 1419 nemocných srovnávali výskyt cytogenetických změn a výskyt mutací v závislosti na přítomnosti stereotypních receptorů (subset #2–8). Přitom pouze u subset #2 a subset #8 prokázali statisticky významný vztah ke specifickým aberacím a mutacím. Autoři prokázali statisticky významný výskyt mutace *SF3B1* (50 %) u nemocných se subset #2, dále vyšší výskyt delece 13q (60 %). U žádného z nemocných se subset #2 nebyla zjištěna delece 17p a trisomie 12. Rossi a kolektiv naopak u nemocných se subset #8 prokázali statisticky významný výskyt trisomie 12 a mutace *NOTCH1*. Práce předkládá koncept určitých stereotypních receptorů jako spouštěčů molekulárně genetických změn ovlivňujících klinický průběh onemocnění, OS a také možný vývoj transformace nemoci (125). Ke stejným pozorováním ve výskytu delece 13q, delece 17p a trisomie 12 u nemocných se subset #2 jsme dospěli také v naší práci.

V našem souboru pacientů s přítomností subgenů *IGHV1-69* jsme ve shodě s literaturou pozorovali vyšší četnost delece 11q, což ale velmi pravděpodobně souvisí s téměř výhradním zastoupením nemutovaného stavu *IGHV* těchto nemocných (127).

### 8.7. Diskuze ke srovnání rizikových podskupin nemocných

Na základě výše uvedené univariantní a multivariantní analýzy jsme definovali „rizikové podskupiny nemocných“ (nemocné s nemutovaným stavem *IGHV*, s delecí 17p, delecí 11q a s přítomností subgenů *IGHV1-69* a *IGHV3-*

21). Tyto nemocné jsme se pokusili porovnat s nemocnými s mutovaným stavem *IGHV* a s celým souborem nemocných. Srovnávanou veličinou byl medián počtu lymfocytů, trombocytů, medián hodnoty hemoglobinu a sérových prognostických markerů B2M a sTk stanovených při diagnóze onemocnění.

Tuto základní statistiku jsme se rozhodli provést vzhledem k velkému objemu dat, která jsme při práci na souboru nemocných získali. Jsme si vědomi určitého zjednodušení vzhledem k překrývání se nemocných v prognostických podskupinách. Ze statistického hlediska by k takovému srovnání mohly být určité oprávněné výhrady.

Přesto grafy popisné statistiky poměrně zajímavým způsobem charakterizují jednotlivé rizikové podskupiny nemocných podle běžně dostupných parametrů krevního obrazu a vybraných sérových markerů.

Nejvyšší hodnota mediánu počtu lymfocytů byla zjištěna u pacientů s delecí 11q, což koresponduje s velkým objemem nádorové masy, která je u pacientů s delecí 11q popisována i v literatuře (26). Naopak relativně nízká hodnota počtu lymfocytů byla zjištěna u pacientů s delecí 17p, překvapivě nižší než u celého souboru pacientů a jen lehce vyšší než u pacientů s mutovaným stavem *IGHV*. Relativně vysoký medián počtu lymfocytů byl také zjištěn u pacientů se subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69*.

Naopak u pacientů s delecí 17p byl zjištěn nejnižší medián hodnoty hemoglobinu a hodnoty počtu trombocytů. Relativně nízký medián hodnoty hemoglobinu byl zjištěn také u pacientů se subgenem *IGHV3-21*. Mediány počtu trombocytů jsou u všech rizikových podskupin velmi podobné (vyjma uvedené podskupiny pacientů s delecí 17p).

Nejvyšší hodnoty B2M byly zjištěny u pacientů s delecí 17p, vysoké hodnoty dále u pacientů se subgenem *IGHV3-21* a pacientů s nemutovaným stavem *IGHV*. Stejně tak nejvyšší medián hodnoty sTk byl detekován u pacientů s delecí 17p, následován mediánem hodnoty sTK u pacientů s nemutovaným stavem *IGHV* a subgeny *IGHV3-21* a *IGHV1-69*.

Porovnali jsme zastoupení mužského pohlaví u podsouboru nemocných s přítomností subgeny *IGHV1-69* oproti zastoupení mužů v podsouboru se subgenem *IGHV3-21* (76,5 % vs 58,6 %). Rozdíl ale nebyl prokázán jako statisticky významný. Podobná pozorování učinili i jiní autoři (127).

V souhlase s literárními daty byl i v našem souboru pacientů popsán výrazný rozdíl ve výskytu delece 11q a 17p mezi pacienty s mutovaným stavem *IGHV* a nemutovaným stavem *IGHV*. Stilgenbauer a spolupracovníci popsali výskyt delece 11q a 17p u mutovaného stavu *IGHV* v 4 % a 3 %, u stavu nemutovaného byl výskyt delece 11q a 17p v 27 % a 10 % (131). Srovnání výskytu genetických změn v závislosti na mutačním stavu provedli ve své práci také další autoři Gonzáles-Gascón y Marín a kolektiv, kteří uvedli podobný výskyt delece 11q a 17p u obou podsouborů v závislosti na mutačním stavu, který byl statisticky významně rozdílný. Autoři navíc prokazují u mutovaného stavu *IGHV* statisticky významně vyšší výskyt delece 13q a statisticky významně nižší výskyt trisomie 12 (198). Naše výsledky byly naprosto srovnatelné s těmito daty. Pozorovali jsme výskyt delece 11q a 17p v 28,9 % a v 10,6 % u nemocných s nemutovaným stavem *IGHV*, výskyt delece 11q a 17p u nemocných s mutovaným stavem *IGHV* v 5,9 % a v 3,8%. V případě delece 11q i 17p byl prokázán mezi soubory v závislosti na mutačním stavu rozdíl jako statisticky významný.

## 9. Závěry práce

1. Na retrospektivně analyzovaném souboru 417 pacientů s CLL diagnostikovaných na HOK LF UP a FN Olomouc v letech 2000–2011 byl v univariantsní analýze prokázán prognostický význam stanovení klasických (věk > 65 let, počet lymfocytů >  $30 \times 10^9/l$ , klinické stádium onemocnění Binet B a C) a biologických, tzv. nových prognostických faktorů (sérové markery B2M a sTk, nemutovaný stav *IGHV*, delece 17p a delece 11q) ve vztahu k OS u pacientů. Naopak jsme neprokázali prognostický význam hladiny proteinu ZAP-70 a positivity antigenu CD38, stejně tak jako prognostický význam pohlaví pro OS nemocných. V multivariantsní analýze byl prokázán nepříznivý prognostický význam věku > 65 let, nemutovaného stavu *IGHV*, delece 17p a počtu lymfocytů >  $50 \times 10^9/l$  ve vztahu k OS.

Analýza souboru nám také současně poskytla přesné informace o věkovém a prognostickém rozložení nemocných, o které v naší praxi pečujeme.

2. Při cílené a hlubší analýze pacientů s přítomností subgenů *IGHV3-21* a *IGHV1-69* jsme došli k závěru, že tito pacienti mají stejně nepříznivou prognózu jako ostatní pacienti s nemutovaným stavem *IGHV* a že přítomnost delece 17p celkové přežití nemocných v obou podskupinách dále zkracuje. U nemocných s přítomností subgenů *IGHV3-21* ovlivňuje OS přítomnost dalších prediktivních faktorů, což dokládá heterogenitu a rozdílnou prognózu těchto pacientů, ve srovnání s podskupinou pacientů s přítomností subgenů *IGHV1-69*, kterou naopak hodnotíme jako biologicky a prognosticky homogenní.

Samotný výskyt *IGHV3-21* je potom dle výsledku multivariantsní analýzy nezávislým prognostickým faktorem OS u nemocných s CLL ve stádiu Binet A.

Pacienty s přítomností subgenů *IGHV3-21* zejména s ohledem na výskyt stereotypního receptoru subset #2 hodnotíme stran biologických charakteristik a průběhu onemocnění jako velmi zajímavou podskupinu nemocných vhodnou k dalšímu studiu.

V budoucnu plánujeme studovaný soubor rozšířit o další nemocné, a to jak z našeho pracoviště, tak i případně z dalších hematologických center České republiky, a práci doplnit o studium nových mutací (*SF3B1*, *BIRC3*, *NOTCH1* a *p53*).

3. S ohledem na výsledky naší práce jsme v klinické praxi HOK LF UP a FN Olomouc aktualizovali doporučení vyšetřování prognostických faktorů. Tato aktualizace mimo jiné vedla k upuštění od stanovení míry exprese proteinu ZAP-70 v nádorových buňkách CLL a výskytu antigenu CD38 jakožto prognostických faktorů.

## 10. Souhrn

Chronická lymfocytární leukémie je onemocnění s heterogenním klinickým průběhem, proto mělo a stále má význam stanovení individuální prognózy nemocných. Jsou studovány stále další, potenciální prognostické faktory, které mohou mít význam pro cílenou léčbu agresivnějších forem onemocnění.

Studiu prognostických faktorů u CLL se věnujeme na HOK LF UP a FN Olomouc systematicky více než 15 let. Cílem předložené práce tedy bylo analyzovat výsledky při diagnóze onemocnění stanovovaných klasických a nových biologických prognostických faktorů. Studovaný soubor měl 417 nemocných, medián sledování byl 50 měsíců. Význam jednotlivých prognostických faktorů byl studován ve vztahu k celkovému přežití těchto nemocných.

Zcela zásadní prognostickou roli ve vztahu k OS má stanovení mutačního stavu *IGHV*, kde pacienti s nemutovaným stavem mají horší prognózu (OS 86 měsíců) než pacienti s mutovaným stavem (OS 206 měsíců). Multivariátní analýza prokázala vedle významu stanovení mutačního stavu *IGHV* také nepříznivý prognostický význam věku > 65 let, počtu lymfocytů >  $50 \times 10^9/l$  a delece 17p.

Určitou výjimkou z pravidla o lepší prognóze nemocných s mutovaným stavem *IGHV* tvoří pacienti se subgenem *IGHV3-21*. Proto jsme se analýze tohoto podsouboru 29 nemocných věnovali podrobně. Neprokázali jsme u nich skutečně rozdílné přežití v závislosti na mutačním stavu *IGHV*. OS všech nemocných s *IGHV3-21* byl 97 měsíců, TFS byl 9 měsíců. Pokud byli dále analyzováni nemocní v časném klinickém stádiu Binet A, pak v multivariátní analýze nemocní se subgenem *IGHV3-21* mají kratší přežití než ostatní nemocní tohoto stádia. Podsoubor nemocných se subgenem *IGHV3-21* hodnotíme jako prognosticky nepříznivou, heterogenní podskupinu. V závislosti na výskytu stereotypního receptoru subset #2 u těchto nemocných byl studován výskyt rekurentních cytogenetických aberací, ve shodě s literaturou jsme popsali specifický vzor genetických změn.

Další analyzovanou podskupinou (51 nemocných) byli nemocní se subgenem *IGHV1-69*. OS těchto nemocných byl 85 měsíců a TFS 9 měsíců,

jedná se o prognosticky nepříznivou homogenní podskupinu nemocných s predilekčním zastoupením nemocných s nemutovaným stavem *IGHV*.

Četné práce z posledních pěti let ukazují, že využití kombinace klasických (věk, pohlaví, počet lymfocytů, stádium onemocnění) a některých nových prognostických faktorů (B2M, stanovení mutačního stavu *IGHV* a genetických změn 11q- a 17p-) ve formě prognostických indexů může predikovat interval do zahájení léčby a celkové přežití daného nemocného. Během naší práce se jevila velmi zajímavou možnost ověření platnosti některého z prognostických indexů, ale bohužel z hlediska statistického hodnocení se nejednalo o dostatečně velký soubor nemocných.

V analýzách prognostických faktorů pracujeme i nadále, zejména s ohledem na výsledky nově vyšetřovaných mutací *p53*, *NOTCH1*, *SF3B1* a *BIRC3*.



## 11. Abecední seznam zkratk

ALC absolutní počet lymfocytů  
ANC absolutní počet neutrofilů  
B2M beta 2mikroglobulin  
BCR B buněčný receptor  
BR bendamustin+rituximab  
CGH komparativní genomová hybridizace  
CIHP centrum intenzivní hematologické péče  
CIRS Cumulative Illness Rating Scale  
Clb chlorambucil  
CLL B chronická lymfocytární leukémie  
CML chronická myeloidní leukémie  
CMV cytomegalovirus  
COP cyklofosfamid, vinkristin, prednison  
CR kompletní remise  
D1 den (první) chemoterapie  
DHAP dexametazon, cytosin arabinosid, cisplatina  
ECOG Eastern Cooperative Oncology Group  
EGIL European Group for the Immunological Characterization of Leukemias  
EORTC European Organisation for Research and Treatment of Cancer  
ESMO European Society for Medical Oncology  
FC fludarabin + cyklofosfamid  
FM fludarabin + mitoxantron  
FCR fludarabin + cyklofosfamid + rituximab  
FISH fluorescenční in situ hybridizace  
GCSF granulocytární kolonie stimulující faktor  
HIV virus lidské imunodeficiency  
HR index rizika (hazard ratio)  
HSC hematopoetická kmenová buňka  
CHOP cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison  
*IGHV, IgVH* variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu  
IWCLL International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia

KD kostní dřeň  
K-M Kaplan-Maierova křivka  
KO krevní obraz  
KS klinické stádium onemocnění  
LDH laktátdehydrogenáza  
M CLL B chronická lymfocytární leukémie s mutovaným stavem *IGHV*  
MBL monoklonální B lymfocytóza  
MRN minimální reziduální nemoc  
NCIWG National Cancer Institute Working Group  
NHL nehodgkinský lymfom  
ORR celková léčebná odpověď  
PD progresivní choroba  
PFS progression free survival  
PK periferní krev  
PR parciální remise  
PS performans status  
Q lite léčebný protokol České CLL skupiny  
R rituximab  
RS Richterův syndrom  
SD stabilní onemocnění  
SHM somatic hypermutation  
sTk sérová thymidinkináza  
TFS treatment-free survival  
TTF time to treatment failure  
VHB virus hepatitidy B  
VHC virus hepatitidy C  
11q- delece 11q  
17p- delece 17p  
13q- delece 13q

## 12. Citace literatury

1. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56.
2. Melo JV, Catovsky D, Galton DA. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group. *Br J Haematol*. 1986;63(2):377-87.
3. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130(3):325-32.
4. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359(6):575-83.
5. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997;108(4):378-82.
6. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, et al. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*. 1998;51(5):364-9.
7. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2004;13(3):279-87.
8. Zent CS, Kyasa MJ, Evans R, et al. Chronic lymphocytic leukemia incidence is substantially higher than estimated from tumor registry data. *Cancer*. 2001;92(5):1325-30.
9. Doubek M, Panovská, A., Janča, J., et al. Co víme o incidenci chronické lymfocytární leukémie (CLL), a kde a jak jsou nemocní s CLL léčeni? *Transfuze a hematologie dnes*. 2010;16(1):11-5.
10. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995;333(16):1052-7.
11. Eichhorst B, Dreyling M, Robak T, et al. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 6:vi50-4.
12. Plass C, Byrd JC, Raval A, et al. Molecular profiling of chronic lymphocytic leukaemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes. *Br J Haematol*. 2007;139(5):744-52.
13. Vrijheid M, Cardis E, Ashmore P, et al. Ionizing radiation and risk of chronic lymphocytic leukemia in the 15-country study of nuclear industry workers. *Radiat Res*. 2008;170(5):661-5.
14. Blair A, Purdue MP, Weisenburger DD, et al. Chemical exposures and risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2007;139(5):753-61.
15. Kalil N, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia. *Oncologist*. 1999;4(5):352-69.
16. Osler W. Leukemia. In: Lange E, Norwalk, C. T., ed. *The Principles and Practice of Medicine*: Appleton; 1909:731.
17. Minot GB, Isaacs, R. Lymphatic Leukemia; Age Incidence, Duration, and Benefit Derived from Irradiation. *Boston Med Surg J*. 1924;191(3):1-9.
18. Galton DA. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Can Med Assoc J*. 1966;94(19):1005-10.
19. Aisenberg AC, Bloch KJ. Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. *N Engl J Med*. 1972;287(6):272-6.
20. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.

21. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.
22. Gahrton G, Robert KH, Friberg K, et al. Extra chromosome 12 in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 1980;1(8160):146-7.
23. Caligaris-Cappio F, Gobbi M, Bofill M, et al. Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1982;155(2):623-8.
24. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87(12):4990-7.
25. Lens D, Dyer MJ, Garcia-Marco JM, et al. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol*. 1997;99(4):848-57.
26. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997;89(7):2516-22.
27. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.
28. Gellhorn A, Hyman GA, Ultmann JE. Chlorambucil in treatment of chronic lymphocytic leukemia and certain lymphomas. *J Am Med Assoc*. 1956;162(3):178-83.
29. Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, et al. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1989;74(1):19-25.
30. Hale G, Waldmann H, Dyer M. Specificity of monoclonal antibody Campath-1. *Bone Marrow Transplant*. 1988;3(3):237-9.
31. Michallet M, Archimbaud E, Bandini G, et al. HLA-identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with chronic lymphocytic leukemia. European Group for Blood and Marrow Transplantation and the International Bone Marrow Transplant Registry. *Ann Intern Med*. 1996;124(3):311-5.
32. O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, et al. Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2001;19(8):2165-70.
33. Byrd JC, Murphy T, Howard RS, et al. Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J Clin Oncol*. 2001;19(8):2153-64.
34. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*. 1967;29(4):Suppl:566-84.
35. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804-15.
36. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):37-50.
37. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-7.
38. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. 2003;101(12):4952-7.
39. Messmer BT, Albesiano E, Messmer D, et al. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood*. 2004;103(9):3490-5.

40. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. 2005;105(4):1678-85.
41. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
42. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13944-9.
43. Dohner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6):1580-9.
44. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2007;129(5):879-90.
45. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, et al. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(2):748-53.
46. Austen B, Powell JE, Alvi A, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*. 2005;106(9):3175-82.
47. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
48. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):2262-4.
49. Pritsch O, Troussard X, Magnac C, et al. VH gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;107(3):616-24.
50. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998;102(8):1515-25.
51. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. 2008;264(6):549-62.
52. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007;109(1):259-70.
53. Dal-Bo M, Bertoni F, Forconi F, et al. Intrinsic and extrinsic factors influencing the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia: prognostic markers with pathogenetic relevance. *J Transl Med*. 2009;7:76.
54. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, et al. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(7):405-18.
55. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(13):4609-14.
56. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2009;23(4):686-97.
57. Hanada M, Delia D, Aiello A, et al. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1993;82(6):1820-8.
58. Thomas A, El Rouby S, Reed JC, et al. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene*. 1996;12(5):1055-62.

59. Kitada S, Andersen J, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91(9):3379-89.
60. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.
61. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992;356(6366):215-21.
62. Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, et al. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. 2004;119(6):861-72.
63. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. 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*. 2002;100(4):1177-84.
64. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol*. 2009;27(10):1637-43.
65. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol*. 2009;27(1):1-10.
66. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):995-1004.
67. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009;114(26):5307-14.
68. Zenz T, Habe S, Denzel T, et al. How little is too much? p53 inactivation: from laboratory cutoff to biological basis of chemotherapy resistance. *Leukemia*. 2008;22(12):2257-8.
69. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, et al. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*. 1996;92(1):97-103.
70. Caligaris-Cappio F. Inflammation, the microenvironment and chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(3):353-5.
71. Schimmer A, Munk-Pedersen I, Minden M, et al. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*. 2003;4(3):211-8.
72. Stamatopoulos B, Haibe-Kains B, Equeter C, et al. Gene expression profiling reveals differences in microenvironment interaction between patients with chronic lymphocytic leukemia expressing high versus low ZAP70 mRNA. *Haematologica*. 2009;94(6):790-9.
73. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, et al. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:135-45.
74. Soma LA, Craig FE, Swerdlow SH. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol*. 2006;37(2):152-9.
75. Shanafelt TD, Kay NE. The clinical and biologic importance of neovascularization and angiogenic signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33(2):174-85.
76. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*. 2002;16(5):911-9.
77. Duensing S, Atzpodien J. Increased intracellular and plasma levels of basic fibroblast growth factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1995;85(7):1978-80.

78. Molica S, Vitelli G, Levato D, et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1999;107(3):605-10.
79. Smolej L. Význam mikroprostředí u chronické lymfocytární leukemie. *Transfuze a hematologie dnes.* 2010;1(16):24-8.
80. Molica S, Vacca A, Ribatti D, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;100(9):3344-51.
81. Mraz M, Pospisilova S, Malinova K, et al. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(3):506-9.
82. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1793-801.
83. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell.* 2011;20(2):246-59.
84. Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev.* 2008;22(4):211-9.
85. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5(6):649-55.
86. Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:279-84.
87. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 1987;60(11):2712-6.
88. Vinolas N, Reverter JC, Urbano-Ispizua A, et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance. *Blood Cells.* 1987;12(2):457-70.
89. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol.* 1986;62(3):567-75.
90. Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL, et al. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica.* 1994;79(4):334-41.
91. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol.* 1989;72(2):141-9.
92. Bosch F, Montserrat E. Refining prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2002;6(4):335-49; discussion 449-50.
93. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014.
94. Molica S, Brugiattelli M, Callea V, et al. Comparison of younger versus older B-cell chronic lymphocytic leukemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. *Eur J Haematol.* 1994;52(4):216-21.
95. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood.* 1999;94(2):448-54.
96. Parikh SA, Kapoor P, Letendre L, et al. Prognostic factors and outcomes of adults with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Mayo Clin Proc.* 2014;89(4):484-92.
97. Baccarani M, Cavo M, Gobbi M, et al. Staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1982;59(6):1191-6.

98. Melo JV, Catovsky D, Galton DA. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia: a clinicopathological reappraisal. *Blood Cells*. 1987;12(2):339-53.
99. Vallespi T, Montserrat E, Sanz MA. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. *Br J Haematol*. 1991;77(4):478-85.
100. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109(11):4679-85.
101. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(31):4088-95.
102. Bulian P, Rossi D, Forconi F, et al. IGHV gene mutational status and 17p deletion are independent molecular predictors in a comprehensive clinical-biological prognostic model for overall survival prediction in chronic lymphocytic leukemia. *J Transl Med*. 2012;10:18.
103. Gentile M, Cutrona G, Neri A, et al. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*. 2009;94(6):887-8.
104. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*. 1996;22(5-6):439-47.
105. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;93(5):1732-7.
106. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(4):1410-6.
107. Tobin G, Thunberg U, Laurell A, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia with mutated VH genes presenting with Binet stage B or C form a subgroup with a poor outcome. *Haematologica*. 2005;90(4):465-9.
108. Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;108(3):853-61.
109. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-75.
110. Schroers R, Griesinger F, Trumper L, et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005;19(5):750-8.
111. Rossi FM, Del Principe MI, Rossi D, et al. Prognostic impact of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: mean fluorescence intensity T/B ratio versus percentage of positive cells. *J Transl Med*. 2010;8:23.
112. Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: non-Hodgkin's lymphomas. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010;8(3):288-334.
113. Schroeder HW, Jr., Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*. 1994;15(6):288-94.
114. Johnson TA, Rassenti LZ, Kipps TJ. Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *J Immunol*. 1997;158(1):235-46.
115. Matthews C, Catherwood MA, Morris TC, et al. V(H)3-48 and V(H)3-53, as well as V(H)3-21, gene rearrangements define unique subgroups in CLL and are



- associated with biased lambda light chain restriction, homologous Lcdr3 sequences and poor prognosis. *Leuk Res.* 2007;31(2):231-4.
116. Herve M, Xu K, Ng YS, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1636-43.
  117. Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood.* 2003;102(3):1035-41.
  118. Krober A, Bloehdorn J, Hafner S, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2006;24(6):969-75.
  119. Thorselius M, Krober A, Murray F, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood.* 2006;107(7):2889-94.
  120. Cahill N, Sutton LA, Jansson M, et al. IGHV3-21 gene frequency in a Swedish cohort of patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012;12(3):201-6.
  121. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia.* 2010;24(1):125-32.
  122. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood.* 2012;119(19):4467-75.
  123. Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, et al. High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica.* 2010;95(9):1519-25.
  124. Dal-Bo M, Del Giudice I, Bomben R, et al. B-cell receptor, clinical course and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia: the growing saga of the IGHV3 subgroup gene usage. *Br J Haematol.* 2011;153(1):3-14.
  125. Rossi D, Spina V, Bomben R, et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121(24):4902-5.
  126. Panovska-Stavridis I, Ivanovski M, Siljanovski N, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients with a V1-69 gene rearrangement do not have inferior survival with respect to patients that express other unmutated V(H) genes. *Leuk Res.* 2007;31(2):245-8.
  127. Orlandi EM, Zibellini S, Pascutto C, et al. IGHV unmutated status influences outcome more than IGHV1-69 gene usage per se in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009;9(5):390-3.
  128. Mauerer K, Zahrieh D, Gorgun G, et al. Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;129(4):499-510.
  129. Galligan L, Catherwood MA, Matthews C, et al. Mutated IgHV1-69 gene usage represents a distinct subgroup associated with indolent disease in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(4):763-8.
  130. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med.* 1990;323(11):720-4.
  131. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia.* 2002;16(6):993-1007.

132. Stilgenbauer S, Lichter P, Dohner H. Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2000;4(1):48-72.
133. Chena C, Avalos JS, Bezares RF, et al. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol.* 2008;81(2):94-9.
134. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol.* 1996;92(2):382-8.
135. Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol.* 2004;22(19):3937-49.
136. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;107(3):885-91.
137. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1164-74.
138. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia.* 2010;24(12):2072-9.
139. Zenz T, Krober A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* 2008;112(8):3322-9.
140. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:163-83.
141. Zenz T, Habe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood.* 2009;114(13):2589-97.
142. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia.* 2009;23(1):117-24.
143. Stankovic T, Weber P, Stewart G, et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 1999;353(9146):26-9.
144. Guarini A, Marinelli M, Tavoraro S, et al. ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica.* 2012;97(1):47-55.
145. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28(29):4473-9.
146. Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(9):579-90.
147. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol.* 2012;30(36):4524-32.
148. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med.* 2011;208(7):1389-401.
149. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011;475(7354):101-5.
150. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol.* 2010;151(4):404-6.

151. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(2):521-9.
152. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*. 2013;121(3):468-75.
153. Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, et al. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27(24):3994-4001.
154. Mansouri L, Cahill N, Gunnarsson R, et al. NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(2):512-4.
155. Rossi D, Brusca A, Spina V, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-8.
156. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-506.
157. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(12):2854-62.
158. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44(1):47-52.
159. Foa R, Del Giudice I, Guarini A, et al. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(5):675-85.
160. Fazi C, Scarfo L, Pecciarini L, et al. General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood*. 2011;118(25):6618-25.
161. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood*. 2011;117(12):3391-401.
162. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2223-9.
163. Shanafelt TD, Witzig TE, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24(28):4634-41.
164. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica*. 2007;92(9):1242-5.
165. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(7):1458-61.
166. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1403-12.
167. Richter MN. Generalized Reticular Cell Sarcoma of Lymph Nodes Associated with Lymphatic Leukemia. *Am J Pathol*. 1928;4(4):285-92.
168. Rossi D, Cerri M, Capello D, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol*. 2008;142(2):202-15.
169. Thornton PD, Bellas C, Santon A, et al. Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. The possible role of fludarabine and the Epstein-Barr virus in its pathogenesis. *Leuk Res*. 2005;29(4):389-95.

170. Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2006;24(15):2343-51.
171. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer*. 2005;103(2):216-28.
172. Shanafelt TD, Jenkins G, Call TG, et al. Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2009;115(2):363-72.
173. Molica S, Giannarelli D, Gentile M, et al. External validation on a prospective basis of a nomogram for predicting the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2013;119(6):1177-85.
174. Bottcher S, Ritgen M, Fischer K, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):980-8.
175. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:481-8.
176. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*. 2007;21(1):12-7.
177. Eichhorst BF, Fischer K, Fink AM, et al. Limited clinical relevance of imaging techniques in the follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia: results of a meta-analysis. *Blood*. 2011;117(6):1817-21.
178. Smolej L, Doubek M, Špaček M, et al. Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie (CLL). *Transfuze a hematologie dnes*. 2013;19(2):61-8.
179. Smolej L. Therapy of elderly/comorbid patients with chronic lymphocytic leukemia. *Curr Pharm Des*. 2012;18(23):3399-405.
180. Oscier D, Dearden C, Eren E, et al. Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;159(5):541-64.
181. Knauf WU, Lissitchkov T, Aldaoud A, et al. Bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia: updated results of a randomized phase III trial. *Br J Haematol*. 2012;159(1):67-77.
182. Kaufman M, Limaye SA, Driscoll N, et al. A combination of rituximab, cyclophosphamide and dexamethasone effectively treats immune cytopenias of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(6):892-9.
183. Mauro FR, Bandini G, Barosi G, et al. SIE, SIES, GITMO updated clinical recommendations for the management of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2012;36(4):459-66.
184. Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*. 2002;99(10):3554-61.
185. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1749-55.
186. Smolej L. The role of high-dose corticosteroids in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21(7):1009-17.
187. Smolej L, Doubek M, Panovska A, et al. Rituximab in combination with high-dose dexamethasone for the treatment of relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2012;36(10):1278-82.
188. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a

- multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2011;29(26):3559-66.
189. Tonino SH, van Gelder M, Eldering E, et al. R-DHAP is effective in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2010;24(3):652-4.
  190. Delgado J, Duarte RF. Practical aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients with poor-risk chronic lymphocytic leukemia. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:161-72.
  191. Montserrat E, Gribben JG. Autografting CLL: the game is over! *Blood*. 2011;117(23):6057-8.
  192. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:138-50.
  193. Jarosova M, Jedlickova K, Holzerova M, et al. Contribution of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization to the detection of chromosomal abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Onkologie*. 2001;24(1):60-5.
  194. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317.
  195. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W503-8.
  196. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol*. 2009;144(4):492-506.
  197. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, 2nd, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood*. 2008;111(10):5101-8.
  198. Gonzalez-Gascon YMI, Hernandez JA, Martin A, et al. Mutation status and immunoglobulin gene rearrangements in patients from northwest and central region of Spain with chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Res Int*. 2014;2014:257517.
  199. Bulian P, Tarnani M, Rossi D, et al. Multicentre validation of a prognostic index for overall survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Oncol*. 2011;29(2):91-9.
  200. Gentile M, Mauro FR, Rossi D, et al. Italian external and multicentric validation of the MD Anderson Cancer Center nomogram and prognostic index for chronic lymphocytic leukaemia patients: analysis of 1502 cases. *Br J Haematol*. 2014;167(2):224-32.
  201. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev*. 2009;23(1):25-47.
  202. Molica S. Progression and survival studies in early chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1991;78(4):895-9.
  203. Molica S, Mauro FR, Callea V, et al. The utility of a prognostic index for predicting time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia: the GIMEMA experience. *Haematologica*. 2010;95(3):464-9.
  204. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, et al. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica*. 2008;93(3):473-4.