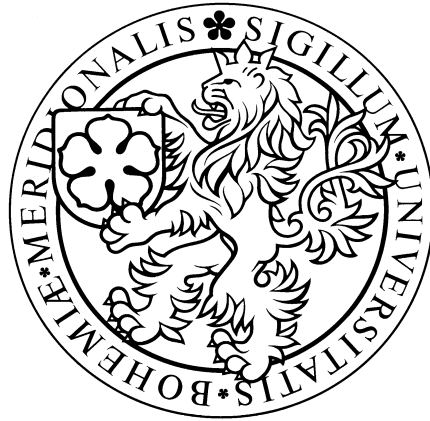


Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity
v Českých Budějovicích



Magisterská práce

Analýza mutačního stavu IgVh genu u pacientů s chronickou
lymfatickou leukémií

Bc. Daniela Šantová

2010

vedoucí práce: Mgr. Ondřej Scheinost

Šantová, D. (2010). Analýza mutačního stavu IgVh genu u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií [Analysis of the mutational status IgVh genes in patients with chronic lymphocytic leukemia. Mgr. Thesis, in Czech] Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotation:

The thesis is focused on diagnostics of chronic lymphocytic leukemia emphasising predictive factors determination, concretely mutation status of rearranged IgVH gene. The lymphocyte clonality is defined first from blood (bone marrow) sample of CLL patients, subsequently the IgVH family and hypermutation rate are determined.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 28. 4. 2010

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ondrovi Scheinostovi za pomoc při tvorbě práce. Mé velké dík patří Petře Duškové, která mě zasvětila do problematiky a vždy, když jsem potřebovala, přispěla radou a Jarce Zvoníkové. Děkuji všem členům naší laboratoře za podporu a vytvoření příjemného a přátelského prostředí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům za trpělivost a podporu. Speciální poděkování patří Lukáši Valentovi, protože nebýt jeho, tahle práce vůbec nevznikla. Děkuji.

Obsah:

1. Úvod	6
1.1. Chronická lymfatická leukémie	6
1.1.1. Klinický obraz chronické lymfatické leukémie	6
1.2. Vývoj zdravého lymfocytu	7
1.2.1. Vývojová řada krevních buněk	7
1.2.2. Morfologické rozlišení lymfoidních buněk	8
1.2.2.1. Lymfoblast	8
1.2.2.2. Prolymfocyt	8
1.2.2.3. Lymfocyt	8
1.3. Přestavba imunoglobulinových genů	9
1.4. Rodiny V _H genů	14
1.5. Diagnostická kritéria	14
1.6. Prognostické faktory	15
1.6.1. Klasické prognostické markery	15
1.6.1.1. Stážovací systémy podle Raie a Bineta	15
1.6.1.2. Zdvojoací čas lymfocytů	15
1.6.1.3. Morfologické změny	17
1.6.2. Biologické prognostické markery	17
1.6.2.1. Cytogenetické markery	17
1.6.2.1.1. Delece 13q	17
1.6.2.1.2. Trisomie 12	17
1.6.2.1.3. Delece 17p	18
1.6.2.1.4. Delece 11q	18
1.6.2.1.5. Význam cytogenetických markerů	19
1.6.2.2. Sérové prognostické markery	19
1.6.2.2.1. Beta-2-mikroglobulin	19
1.6.2.2.2. Sérová CD23	19
1.6.2.2.3. Thymidin kináza	19
1.6.2.3. Molekulární prognostické markery	20
1.6.2.3.1. ZAP-70	20
1.6.2.3.2. Mutační status	21
1.6.2.3.2.1. V1-69, V3-21	22

1.6.2.3.3. Exprese CD38	23
1.6.2.3.4. Bcl-2	23
1.6.2.3.5. Micro RNA	24
1.7. Léčba	25
1.7.1. Indikace k zahájení léčby	25
1.7.2. Léčba nemocných s pokročilým onemocněním	25
1.7.2.1. Léčebná strategie	25
1.7.2.2. Kortikosteroidy	25
1.7.2.3. Alkylační cytostatika	25
1.7.2.4. Radioterapie	25
1.7.2.5. Purinová analoga	26
1.7.2.6. Monoklonální protilátky	26
1.7.2.7. Transplantace	26
1.7.2.8. Podpůrná léčba	26
1.8. Praktický význam prognostických faktorů	27
1.8.1. Klasické prognostické markery	27
1.8.2. Cytogenetika	27
1.8.3. Molekulární prognostické markery	27
1.9. Více klonální přestavby	28
1.10. Cíle práce	29
2. Materiál a metody	30
2.1. Získávání vzorků	30
2.2. Metodika stanovení mutačního statusu variabilního segmentu těžkého řetězce imunoglobulinů	30
2.2.1. Izolace RNA z periferní krve	31
2.2.2. Reverzní transkripce	32
2.2.3. PCR	33
2.2.4. Elektroforéza	34
2.2.5. Fragmentační analýza	34
2.2.6. Přečistění PCR produktu	34
2.2.7. Příprava vzorku na sekvenci	35
3. Výsledky	37
3.1. Stanovení klonality	37

3.2. Stanovení rodiny přestavěného IgVh genu	39
3.3. Stanovení rozsahu hypermutací	42
3.4. Klinické výsledky	44
4. Diskuze	45
5. Souhrn	50
6. Literatura	51
7. Přílohy	58
Příloha 1	58
Příloha 2	59
Příloha 3	61

1. Úvod

1.1. Chronická lymfatická leukemie

Chronická B-lymfatická leukemie je nízce agresivní lymfoproliferativní onemocnění, jehož podstatou je proliferace a akumulace klonálních, maligně transformovaných vyzrálých B-lymfocytů s charakteristickým imunofenotypem (Chen et McMillan, 2008). Tyto lymfocyty nepodléhají apoptotické smrti tak rychle jako zdravé buňky, takže postupný vzrůst počtu lymfocytů je způsoben nejen nekontrolovanou klonální proliferací, ale také poruchou jejich zániku a jejich dlouhověkostí (Chen et McMillan, 2008).

B-CLL je nejčastější leukemií dospělých v Evropě a Severní Americe, kde tvoří 25-30% všech leukemií. Její incidence je v Evropě 3/100000. B-CLL se jen zřídka objevuje u lidí mladších padesáti let, obvyklá je až u starší populace, je dvakrát častější u mužů než u žen a nepostihuje děti. Zároveň mají muži horší prognózu. Familiární výskyt chronické lymfatické leukémie je vzácný, přími příbuzní pacientů s B-CLL však mají oproti průměrné populaci třikrát vyšší pravděpodobnost získat tuto chorobu nebo jiné lymfoproliferativní onemocnění. U příbuzných pacientů s B-CLL jsou také častější autoimunitní nemoci než v průměrné populaci.

1.1.1. Klinický obraz chronické lymfatické leukemie

Choroba má dlouhé, roky až desetiletí trvající bezpříznakové období, kdy jediným znakem nemoci je lymfocytóza jak v periferním krevním obraze, tak i v kostní dřeni. Diagnóza je u velké části nemocných stanovena při náhodném zjištění lymfocytózy při vyšetření krevního obrazu.

Klinické příznaky se objevují až při pokročilejším stadiu onemocnění, při větší mase maligních buněk. Jsou způsobeny cytokiny produkovanými buňkami B-CLL nebo autoimunitním mechanismem. Typickými příznaky jsou teploty neinfekčního původu, zvýšené noční pocení, úbytek na váze, anémie a trombocytopenie s krvácivými příznaky. Pro B-CLL je typické zvětšení uzlin a sleziny, v pokročilejším stadiu pak infiltrace nelymfatických orgánů, nejčastější je infiltrace prostaty. Pro určení vhodné léčby je potřeba určit etiologii anémie a trombocytopenie.

Pacienti s B-CLL mají už v počátečním stadiu deficit T buněčné imunity a tím zvýšenou náchylnost k častějším virovým infekcím, obzvláště k infekcím plic. Komplikace způsobené virovými onemocněními jsou nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CLL.

Vzhledem k vyššímu věku pacientů umírá většina nemocných z jiných primárních příčin než B-CLL.

1.2. Vývoj zdravého lymfocytu

1. 2. 1. Vývojová řada krevních buněk

Vývojová řada krevních buněk začíná pluripotentní hematopoetickou kmenovou buňkou, která se může dělit, má samoobnovovací schopnost, může plně obnovit krvetvorbu a může se diferencovat do všech typů krevních buněk. Dalším stupněm je multipotentní buňka, která se stále může dělit. Multipotentní buňky jsou dvojího druhu: lymfoidní a myeloidní. Část populace lymfoidních multipotentních buněk opouští kostní dřeň a migruje do brzlíku, kde se dále diferencují na T-lymfocyty. Z buněk lymfoidní linie, které zůstaly v kostní dřeni, vzniknou B-lymfocyty. Diferenciací multipotentních buněk vzniká další generace buněk – buňky progenitorové, které jsou stále schopny se množit. Na povrchu jejich membrán jsou receptory pro růstové faktory, které spouští diferenciaci buněk a jejich vlivem vznikají prekursorové buňky. Prekursorové buňky svým dělením vytvářejí jen linii vedoucí ke zralému krevnímu elementu. Pro každý typ krvinky existuje jedna prekursorová buňka. (příloha 1)

Na povrchu všech krevních buněk se nachází skupina molekul – diferenciací skupina (CD, cluster of differentiation), které mají na svém povrchu stejnou antigenní determinantu – epitop. Tyto epitopy, a tím i celé buňky, lze identifikovat stejnou monoklonální protilátkou. CD nejsou pouze „značky“ na povrchu buňky, ale většina z nich poskytuje důležité vlastnosti buňkám, které je nesou.

Bílá krvinka je krevní buňka, která má schopnost ničit viry, bakterie, plísňe, cizorodé částice, nádorově změněné buňky a vůbec všechny organismu cizí materiály. Bílé krvinky jsou výkonnými buňkami imunitního systému. Bílá krevní složka má, na rozdíl od červené, několik druhů buněk, takže její vývojová řada není jednotná. Rozeznáváme tři hlavní tvary bílýchrvinek: granulocyty, lymfocyty a monocyty. Podle tohoto rozdělení rozlišujeme vývojovou řadu bílé krvinky na řadu myeloidní, lymfocytární a monocytární. Celkový podíl těchto buněk v kostní dřeni činí 50-75%.

V lymfocytární vývojové řadě je prekursorovou buňkou lymfoblast, z něhož se diferencují prolymfocyty, které se již dále nedělí a dozrávají v lymfocyty. Lymfocyty se tvoří v kostní dřeni, thymu, v mízních uzlinách, v mízní tkáni zažívacího ústrojí, sleziny, mandlí a hltanu.

1.2.2. Morfologické rozlišení lymfoidních buněk

Prvotní diagnostika B buněčné lymfatické leukemie se stále provádí podle morfologie a počtu lymfocytů a molekulární a genetická diagnóza se používá až pro potvrzení prvotní diagnózy a k upřesnění stadia a způsobu léčby. Morfologii krevních buněk můžeme pozorovat v krevních roztěrech obarvených podle Giemsy. (příloha 2)

1.2.2.1 Lymfoblast

Velikost 10–14 μm , celkem kulatý tvar. Má velké kulaté nebo vejčité jádro, řídké struktury, slabě se barví. Chromatin je jemněji uspořádán než ve zralém lymfocytu, ale hruběji než v myeloblastu. Jádro je obaleno poměrně silnou jadernou membránou a má ve srovnání s jádrem lymfocytu mnohem světlejší odstín. Nacházejí se zde jedno až dvě ostře ohraničená jádérka. Poměr velikosti jádra k plazmě je 6:1. Při barvení je plazma středně modrá, bez granul, různě široká, ne zcela jasná.

1.2.2.2 Prolymfocyt

Velikost 13–15 μm . Tvoří plynulý přechod mezi lymfoblastem a lymfocytem. Je zpravidla větší než lymfoblast. Poměr velikosti jádra k plazmě činí 4,5:1. Jáderko není již patrné a plazma je větší než u lymfoblastu. V některých prolymfocytech pozorujeme přechod v hrudkovitý vzhled chromatinu, jaký mají zralější lymfocyty.

1.2.2.3 Lymfocyt

Velikost 9–12 μm . Většina lymfocytů má rozměr jen o něco větší než červená krvinka. Je to nejmenší bílá krvinka kolující v periferní krvi. Někdy najdeme lymfocyty mnohem větší než 20 μm , takže rozeznáváme lymfocyty malé, střední a velké. Tvar lymfocytu je zhruba okrouhlý nebo jen lehce nepravidelný. U větších lymfocytů bývají okraje mírně vlnité, zploštělé nebo vtlačené, takže vytvářejí různě velké záhyby. Jádro je poměrně velké a kulaté, oválné nebo na jedné straně vpáčené, zřídka ledvinovité, někdy dokonce zaškrčené. Je ostře ohraničeno od plazmy, nebývá uloženo ve středu, nýbrž skoro vždy excentricky, takže plazmatický lem na okraji buňky je nestejně široký. Poměr velikosti jádra k plazmě činí 1,2 až 1,5:1. Dokonale vy zralý lymfocyt má hrubou strukturu jádra. Jádro je neobyčejně bohaté na chromatin, který je stočen v hustou spleť vláken a uzlů. Proto můžeme někdy zjistit zřetelné hrudky chromatinu, mezi nimiž je chromatinu méně. Plazma je světle modrá. V některých lymfocytech je plazma skoro bezbarvá.

Množství plazmy je různé. V malých lymfocytech je omezena na úzký lem nebo srpek kolem jádra, u větších je plazmy hojně. U některých lymfocytů bývají v plazmě ostře ohraničená červenofialová, hrubá nebo jemná granula. V kostní dřeni bývá 3-10% a v obvodové krvi 15 až 40% lymfocytů.

Normální tvar lymfocytů může být za patologických stavů značně změněn. U některých tvarů lymfatické leukémie nalézáme lymfocyty, které mají téměř jen jádro bez plazmy, chromatin jádra je jemnější.

Lymfocyt typu B se tvoří u člověka ve fetálním období v játrech a v dospělosti v kostní dřeni. Nalézají se převážně v povrchové vrstvě ve folikulárních centrech lymfatických uzlin a sleziny, v lamina propria zažívacího ústrojí, rozptýlené jsou i v kostní dřeni.

1.3. Přestavba imunoglobulinových genů

Konečným diferenciacním stadiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky, které produkují protilátky. Antigenně specifickými receptory B lymfocytů (BCR) jsou povrchové imunoglobuliny, které se skládají ze dvou těžkých (H) a dvou lehkých (L) řetězců (typ κ a λ). Domény na N-konci těžkého i lehkého řetězce jsou variabilní (V_H a V_L). Detaily jejich struktury se liší individuálně mezi molekulami produkovanými různými klony B lymfocytů. Ostatní domény jsou u řetězců téhož typu shodné.

Geny kódující řetězce imunoglobulinů se skládají z většího počtu několika druhů genových segmentů, které při vývoji lymfocytů podléhají přestavbě. Geny kódující H-řetězce imunoglobulinů se nacházejí v genovém komplexu na lidském chromozómu 14. Tento komplex obsahuje na 5' konci skupinu několika set sekvenčně podobných úseků V, dále následuje skupina asi 50 krátkých úseků D, pak skupina 9 krátkých úseků J a na 3' konci jsou tandemově uspořádány geny kódující konstantní části (C) těžkého řetězce (typ α , δ , ϵ , γ , μ). Genové segmenty V kódují aminokyseliny č. 1-101, segmenty D aminokyseliny 102-106 a segmenty J aminokyseliny 107-123 variabilní domény H-řetězců, segmenty C kódují celou konstantní část imunoglobulinového řetězce. Struktura genových komplexů kódujících L-řetězce κ a λ je podobná, ale jednodušší (neobsahují segmenty D a skládají se z menšího počtu úseků V a J). Existuje pouze jeden segment kódující konstantní část řetězce κ , ale několik segmentů kódující velmi podobné subtypy konstantních částí řetězce λ .

Hlavní část komplexu genů V těžkého řetězce na chromozómu 14 je tvořena z více než sta funkčních segmentů rozdělených do 7 rodin. Rodiny segmentů V_H nejsou v imunoglobulinech zastoupeny rovnoměrně (Fais et al., 1998).

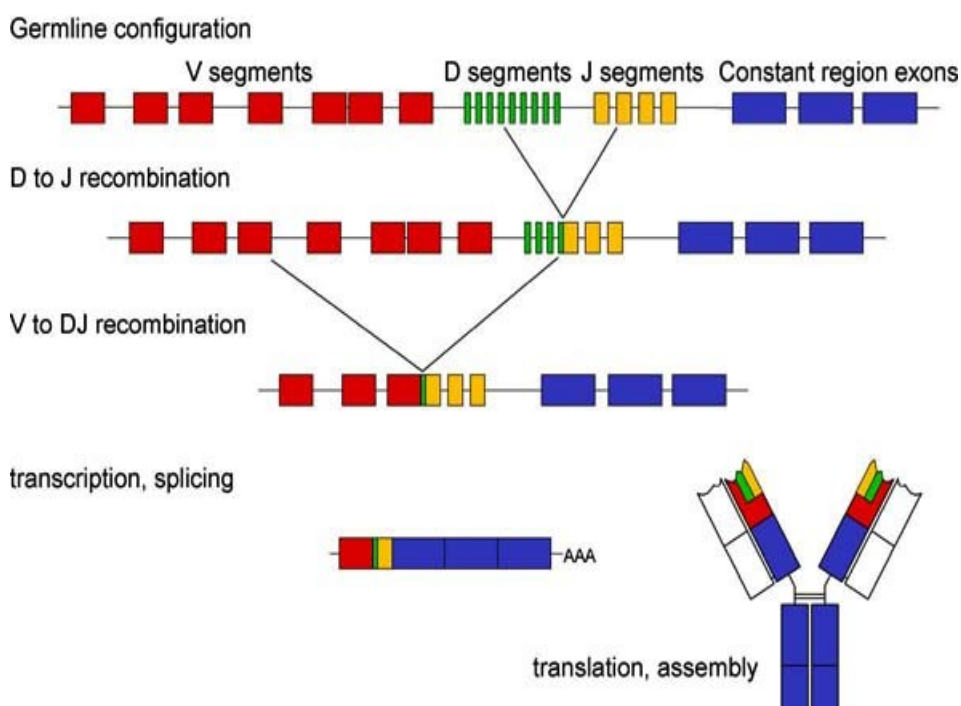
Na koncích V, D a J úseků se nacházejí charakteristické krátké sekvence nukleotidů, které jsou rozeznávány enzymy, které provádějí přeskupování těchto genů. V progenitorech B-lymfocytů (pro-B) dochází nejprve k vyštěpení úseku IgH genového komplexu mezi náhodným D segmentem a některým J segmentem (D-J přeskupení). D-J přeskupování může probíhat i opakovaně, dokud jsou k dispozici nevyštěpené D a J segmenty. Tento děj probíhá v jedné buňce paralelně na obou chromozómech. Poté následuje vyštěpování rozsáhlého úseku mezi některým V segmentem a DJ segmentem (V-D přeskupení). Pokud je přeskupení produktivní a z odpovídající mRNA může vzniknout kompletní H polypeptid, je další přeskupování na druhém chromozómu zastaveno, takže každý B lymfocyt produkuje jen jeden H polypeptid (totéž se stane později i s geny pro L-řetězce).

Po přeskupování segmentů pro variabilní část imunoglobulinového řetězce dochází k tvorbě konstantní části. Nejprve dochází k tvorbě H polypeptidů μ . V okamžiku, kdy buňka úspěšně prošla přeskupováním IgH genů a prokázala to tvorbou μ -řetězců, stává se z ní pre-B lymfocyt. Řetězec μ syntetizovaný v pre-B buňce se nemůže asociovat s L-řetězcí, protože ještě nedošlo k přeskupení jejich genů. Místo L-řetězce však pre-B buňky syntetizují náhradní L-řetězce. Komplex membránového H-řetězce s náhradním L-řetězcem se objevuje na povrchu pre-B lymfocytu a jeho povrchová exprese rozhoduje o dalším osudu buňky. Pokud není tento pre-B receptor funkční a nedojde k navázání antigenu, buňka hyne, v opačném případě se zahájí přeskupování genů pro L-řetězce.

Nejprve začne přeskupování genů kódujících L-řetězce κ . Vyštěpují se opakovaně velké úseky DNA mezi některým V segmentem a některým J segmentem (souběžně na obou chromozómech), dokud některý pokus nevede k produktu poskytujícímu funkční L-řetězec schopný vytvořit s H-řetězcem kompletní povrchový IgM. Jestliže je přeskupování κ genu na jednom chromozómu úspěšné, zastaví se další pokusy na druhém chromozómu. Není-li přeskupení κ genů úspěšné ani na jednom z chromozómů, zahájí se obdobně přeskupování genů λ . Není-li ani to úspěšné, pre-B lymfocyt hyne. V případech, kdy v důsledku nekompatibility H-a L-řetězců nemůže vzniknout stabilní povrchový Ig, daná buňka také hyne.

Dalším důležitým jevem souvisejícím s diferenciací B-lymfocytů a přeskupením

Ig-genů je tzv. izotypový přesmyk. Během terminální diference po aktivaci antigenem dochází k vyštěpování rozsáhlých úseků IgH genů kódujících konstantní části H-řetězce, takže jsou nezvratně ztraceny některé segmenty C. Přitom se ovšem nic neděje s přeskupenou částí genů kódující variabilní část H-řetězce. Po eliminaci části C oblasti IgH genu je pak do mRNA přepsán ten C segment, který je v přeskupeném genu 3' nejbližší VDJ segmentu a po sestřihu a translaci vzniká příslušný izotyp těžkého řetězce odlišný od původního μ .



Obr. 1: VDJ přeskupování (podle Janeway 2001)

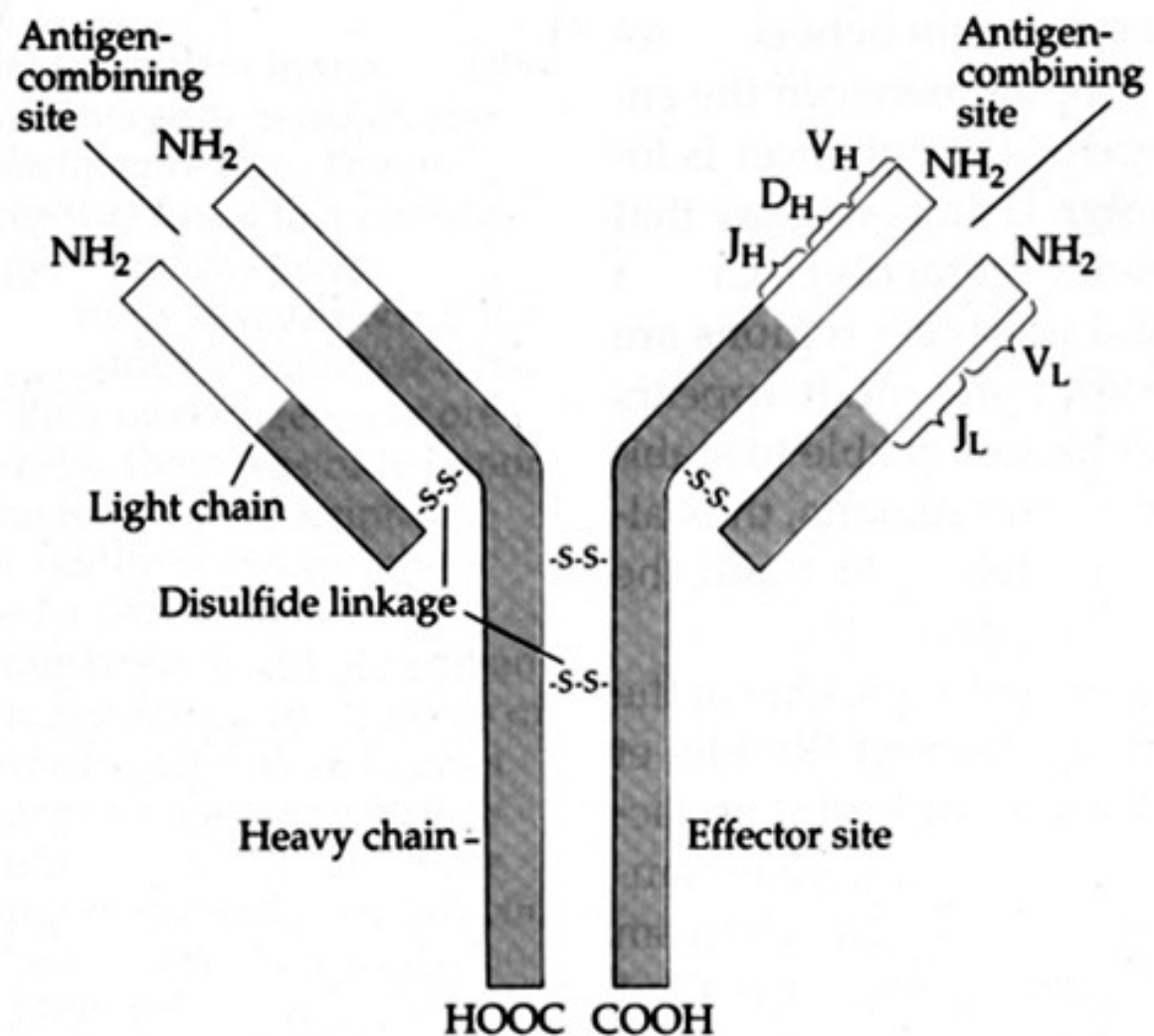
Individuální vyriabilita molekul Ig na povrchu zralých B lymfoctů je dána hlavně různorodostí kombinací V(D)J genových segmentů. Druhým mechanismem výrazně zvyšujícím počet různých výsledných struktur variabilních domén je tzv. spojovací variabilita – po vyštěpení genových úseků během DJ a VD, respektive VJ přeskupení nejsou zbývající konce odštířeny zcela přesně definovaným způsobem a jejich spojením tedy mohou vzniknout nové varianty. Kromě toho působením enzymu terminální transferázy dochází k prodlužování odštířovaných konců o krátké náhodné tzv. N-sekvence, což opět zvyšuje variabilitu.

Pokud dojde ke styku zralého B-lymfocyty s antigenem, je součástí primární aktivace B-lymfocyty iniciace intenzivních mutací V segmentů přeskupených genů, což

vede k dalšímu vzrůstu počtu variant. Tyto náhodné mutace V segmentů mají velký vliv na prognózu pacientů s B-CLL a celkový průběh nemoci. Na principu odhalování přítomnosti/nepřítomnosti těchto mutací je založen jeden z nejlepších prognostických markerů – analýza mutačního stavu těžkých řetězců imunoglobulinových genů.

Vznik variability molekul imunoglobulinů – souhrn

1. VDJ přestavba – dochází k náhodným kombinacím genových segmentů
2. spojovací variabilita – po vyštěpení genových úseků během VDJ přestavby nejsou konce odštířeny vždy stejně a jejich spojováním vznikají nové varianty
3. odštířené konce jsou prodlužovány krátkými náhodnými sekvencemi
4. po styku B-lymfocytu s antigenem dochází k náhodným mutacím ve V segmentu přeskupených genů



Obr. 2: Struktura imunoglobulinu (<http://8e.devbio.com>)

1.4. Rodiny V_H genů

Komplexy genů kódujících V oblast těžkého řetězce imunoglobulinů jsou lokalizovány na několika chromozómech. Hlavní komplex se nachází několik kilobází od konce dlouhého raménka chromozómu 14, další segmenty jsou lokalizovány na chromozómu 15 a 16. Hlavní V_H lokus je 1100 kilobází dlouhý a obsahuje přibližně 95 V_H segmentů. Lidské V_H segmenty jsou rozděleny do sedmi rodin, kde členové jedné rodiny mají minimálně 80% homologii v nukleotidové sekvenci, zatímco členové jiné rodiny jsou více rozdílní (Cook et Tomlinson, 1995).

V_H segmenty jsou funkční, pokud obsahují otevřený čtecí rámeček (ORF) a jsou přestavěny ve funkční imunoglobulinové geny. Pokud jde o počet funkčních V_H segmentů, není počet členů jednotlivých rodin stejný. U pacientů s B-CLL je, co se počtu členů týče, největší rodina V_H4 (38,6% všech funkčních V_H segmentů), následuje rodina V_H3 (30,1%) a V_H1 (24,1%). Rodiny V_H2 (1,2%), V_H5 (2,4%), V_H6 (2,4%) a V_H7 (1,2%) mají jen malé množství funkčních členů (Fais et al., 1998, Cook et Tomlinson, 1995).

Nejčastěji nalezený segment je V_H4-34, který reprezentuje 18,1% všech detekovaných segmentů. Další dva nejčastější segmenty jsou V_H3-07 (12,1%) a V_H1-69 (7,2%) (Fais et al., 1998). Segmenty z rodiny 3 jsou také častěji mutované (66,7% V_H3 segmentů vykazuje <98% homologii ke své odpovídající zárodečné linii), zatímco segmenty z rodiny 1 jsou častěji nemutované (jen 33,3% V_H1 segmentů je mutovaných – viz. 7.2.3.2) (Fais et al., 1998).

Zastoupení jednotlivých rodin V_H segmentů u pacientů s B-CLL je rozdílné než u zdravých lidí. U nemocných jedinců je vyšší pravděpodobnost nalezení V_H1 segmentů a nižší pravděpodobnost výskytu V_H3 segmentů (Fais et al., 1998), zatímco u zdravých jedinců dochází ke zcela náhodnému výběru segmentů a členové všech rodin jsou ve zdravé populaci zastoupeni rovnoměrně (Stevenson et Caligaris-Cappio, 2004, Chiorazzi et al., 2005, Papajik et al., část I, 2006).

1.5. Diagnostická kritéria

Většina nemocných s chronickou lymfatickou leukémií je diagnostikována náhodně při jiném lékařském vyšetření (pravidelná preventivní prohlídka, předoperační vyšetření,...), kdy se ještě nevyskytují symptomy typické pro B-CLL a proto se daří diagnostikovat rannější stadia nemoci.

Pro stanovení základní diagnózy B-CLL je požadováno nejméně $5 \times 10^9/l$ lymfocytů v periferní krvi, které mají morfolonii malých uniformních vyzrálých lymfocytů. V kostní dřeni musí lymfocyty tvořit více než 30% všech jaderných buněk. Pokud se imunofenotyp, který odlišuje B-CLL od jiných typů lymfoidních onemocnění, a morfologie těchto lymfocytů shodují s diagnózou B-CLL, není nutné vyšetřování kostní dřene pro potvrzení diagnózy.

Běžné je, že část lymfocytů bývá atypických, větších, s naštípnutým jádrem nebo lymfocytů s morfologií prolymfocytů. Na základě poměru typických a atypických buněk se dělí B-CLL na subtypy. V diferenciální diagnóze je nutno odlišit jiné typy lymfomů s lymfocytózou, což lze především metodou průtokové cytometrie.

Pro buňky B-CLL je typická přítomnost povrchového imunoglobulinu, intenzita jeho exprese je ale slabá. Druhým typickým znakem buněk B-CLL je přítomnost antigenu CD23. Téměř vždy je přítomen na buňkách B-CLL a je nalézán i na jiných maligních B-lymfocytech. CD23 antigen je často odštěpen a vyskytuje se jako solubilní molekula (sCD23) v séru. Dalšími charakteristickými antigeny na povrchu buněk B-CLL jsou CD5, CD38, CD22, CD19 a CD20.

Histologická vyšetření kostní dřene přináší diagnostické i prognostické informace. Infiltraci kostní dřene u B-CLL lze histologicky klasifikovat do čtyř skupin: intersticiální, modulární, smíšená modulární a intersticiální, difúzní. Intersticiální infiltrace zachovává architekturu kostní dřene, je přítomna u třetiny pacientů ve stadiu A podle Bineta (viz. 7.1.1.). Modulární infiltrace je nalézána u 10%, smíšená u 30% pacientů. Při difúzní formě (20%) hustá infiltrace lymfocyty nahrazuje fyziologickou kostní dřeň a je zcela vytlačena normální krvetvorba.

Chronickou lymfatickou leukemii často provázejí cytogenetické odchylky. Nejčastější chromozomální aberací je trisomie 12. chromozómu (+12q) – vyskytuje se zhruba u 18% nemocných. Strukturální změny dlouhého raménka 13. a 14. chromozómu jsou méně časté. Popisovány jsou i další chromozomální aberace, z nichž mnohé mají prognostickou výpověď.

Některé virové infekce mohou způsobit vzestup počtu lymfocytů na hodnoty shodné s počínající formou B-CLL (např. E-B virózu, HIV, hepatitidy...). Nejen B-CLL, ale i jiné B-lymfoproliferativní onemocnění mohou přejít do fáze se zvýšeným počtem patologických lymfocytů v periferní krvi. Morfologicky se mohou buňkám B-CLL podobat buňky některé formy T-lymfatické leukémie.

Diagnostická kritéria pro stanovení diagnózy B-CLL-souhrn (podle Mayer, 2002)

1. absolutní počet lymfocytů v periferní krvi
 - > $5 \times 10^9/l$ podle kritérií National Cancer Institut Working Group (1996)
 - > $10 \times 10^9/l$ podle kritérií International Workshop on CLL (1986)
2. morfologická kritéria

většina lymfocytů musí odpovídat malým, zralým lymfocytům, jsou rozlišovány tyto morfologické podtypy:

 - typická B-CLL má < 10% atypických lymfocytů
 - smíšená B-CLL/B-PLL s počtem prolymfocytů mezi 11-54%
 - atypická B-CLL s variabilním zastoupením atypických lymfocytů v periferní krvi, ale s < 10% prolymfocytů
3. imunofenotyp: CD5+, CD19+, CD20+, CD23+, CD22-/+
4. počet lymfocytů v kostní dřeni: větší než 30%

1.6. Prognostické faktory

1. 6. 1. Klasické prognostické markery

1.6.1.1. Stážovací systémy podle Raie a Bineta

Prognóza pacienta závisí na tumorózní mase, rychlosti progresu onemocnění a senzitivitě na chemoterapii.

Pro klasifikaci stupně pokročilosti choroby a velikosti masy maligních buněk se používají kritéria, která definovali Rai (tab. 1) a Binet (tab. 2) (Rai et al., 1975, Binet et al., 1981). Stanovení klinického stadia podle uvedených kritérií má prognostický význam. Oba systémy rozdělují pacienty do tří skupin s rozdílnými příznaky (klasifikace podle Raie byla zjednodušena). Tyto klasifikační systémy jsou jednoduché, finančně nenáročné a dají se aplikovat v různých podmínkách po celém světě.

Tab.1: Klinická klasifikace B-CLL podle Raie

stadium	znaky	medián přežití (roky)
0	pouze lymfocytóza v periferní krvi a kostní dřeni	12 – 15
I	lymfocytóza a lymfadenopatie	9
II	lymfocytóza a splenomegalie nebo hepatomegalie	5
III	lymfocytóza a anémie, koncentrace hemoglobinu <110g/l	< 1 – 2
IV	lymfocytóza a trombocytopenie, počet trombocytů <100x10 ⁹ /l	< 1 – 2

Tab. 2: Klinická klasifikace B-CLL podle Bineta

stadium	znaky	medián přežití (roky)
A	jsou splněny podmínky 1,2,3 1. počet postižených oblastí < 3 2. koncentrace hemoglobinu ≥ 100 g/l 3. počet trombocytů ≥ 100x10 ⁹ /l	8
B	jsou splněny podmínky 1,2,3 1. počet postižených oblastí ≥ 3 2. koncentrace hemoglobinu ≥ 100 g/l 3. počet trombocytů ≥ 100x10 ⁹ /l	8
C	bez ohledu na organomegalii je splněna jedna nebo obě podmínky 1. koncentrace hemoglobinu < 100 g/l 2. počet trombocytů < 100x10 ⁹ /l	2
definice postižených oblastí -uzliny hlavy a krku a lymfatická tkáň Waldeyerova okruhu -unilaterální nebo bilaterální postižení axilárních uzlin -unilaterální nebo bilaterální postižení tříselných a povrchových femorálních uzlin -hmatná zvětšená slezina -hmatná zvětšená játra		

1.6.1.2. Zdvojovací čas lymfocytů

Čas potřebný ke zdvojnásobení počtu lymfocytů v periferní krvi (LDT – lymphocyte doubling time) je jednoduchý a klinicky významný prognostický ukazatel. Hodnoty pod 6 měsíců bývají charakteristické pro špatnou prognózu a celkově krátké přežívání pacientů, naopak hodnoty nad 12 měsíců ukazují na lepší průběh nemoci (Montserrat et al., 1986, Molica et Alberti, 1987, Hallek et al., 1999, Hamblin et al., 2002, Del Principe et al., 2006, Papajík et al., část II, 2006, Hallek, 2008.)

Vysoké hodnoty LDT nacházíme často u pacientů ve stadiu Binet A, zatímco ve stadiu B a C je LDT kratší. LDT < 12 měsíců je často spojeno s difúzní infiltrací kostní dřeni (Montserrat et al., 1986, Papajík et al., část II, 2006).

1.6.1.3. Morfologické změny

Počet lymfocytů odráží masu tumoru, proto je průměrné přežití pacientů s počtem lymfocytů na $50 \times 10^9/l$ kratší než u pacientů s počtem lymfocytů pod $50 \times 10^9/l$.

Difúzní postižení kostní dřeně má horší prognózu než nedifúzní infiltrace. Jeho výskyt souhlasí s pokročilejším stadiem nemoci a vysokou agresivitou leukemických buněk. Přežívání pacientů s tímto typem infiltrace kostní dřeně je krátké. Prognostická hodnota určení typu infiltrace kostní dřeně však není vysoká a vzhledem k náročnosti odběru se příliš nepoužívá (Papajík et al., část II, 2006).

Počet prolymfocytů vyšší než 5% zhoršuje prognózu.

1.6.2. Biologické prognostické markery

1.6.2.1. Cytogenetické markery

U pacientů s chronickou lymfatickou leukémií lze často nalézt i různé cytogenetické odchylky, jejichž přítomnost má vliv na prognózu, léčbu a průběh onemocnění. (Hallek, 2008, Chen et McMillan, 2008)

1.6.2.1.1. Delece 13q

Jednou z nejčastějších chromozomálních abnormalit je ztráta či translokace části dlouhého raménka chromozómu 13, na které se nachází několik genů pro mikro RNA (*miR15a*, *miR16-1*) (viz.7.2.3.5.), které ovlivňují exprese anti apoptotického proteinu BCL-2 (Oscier et al., 1997, Dohner et al., 2000, Calin et al., 2005, Chen et McMillan, 2008). Pouze tato delece (del 13q) jako jediná cytogenetická změna a normální karyotyp je spojena s příznivou prognózou (Oscier et al., 1997, Dohner et al., 2000, Krober et al., 2002, Wiestner et al., 2003, Del Principe et al., 2006, Hallek, 2008, Moreno et Montserrat, 2008,). Tato dobrá prognóza pacientů s del 13q souhlasí s tím, že se tato abnormalita vyskytuje u pacientů a IgVh mutovanými geny (viz. 2.3.2.) (Oscier et al., 1997, Hamblin et al., 1999, Krober et al., 2002), choroba zůstává dlouho stabilní a neaktivní a potřeba léčby se objevuje až po delší době.

1.6.2.1.2. Trisomie 12

Dalším velmi častým nálezem je trisomie 12 (Oscier et al., 1997, Dohner et al., 2000, Hallek, 2008). Trisomie chromozómu 12 je spojována s pokročilejším stadiem nemoci a může sloužit jako marker špatné prognózy (Oscier et al., 1997). Je často spojena s atypickou morfologií lymfocytů a tím i špatnou prognózou (Oscier et al., 1997) Tato

abnormalita je častá u pacientů s nemutovanými imunoglobulinovými geny (Oscier et al., 1997, Hamblin et al., 1999, Hamblin et al., 2002) a vysokou hladinou exprese ZAP-70 (Wiestner et al., 2003).

1.6.2.1.3. Delece 17p

Nejhorší klinický výstup má delece krátkého raménka chromozómu 17 (del 17p), která je charakterizována velmi rychlou progresí nemoci, krátkou dobou přežívání pacientů a špatnou odpovědí na léčbu (Dohner et al., 2000, Krober et al., 2002, Wiestner et al., 2003, Del Principe et al., 2006, Hallek, 2008, Chen et McMillan, 2008, Ure et al., 2009.). Tato delece je velmi častá a vyskytuje se téměř výhradně u pacientů s nemutovanými imunoglobulinovými geny (Krober et al., 2002, Montserrat et Moreno, 2008) a vysokou hladinou exprese ZAP-70 (Montserrat et Moreno, 2008, Moreno et Montserrat, 2008). Na krátkém raménku chromozómu 17 se nachází důležitý tumor supresorový gen *TP53*, který koduje proteiny rodiny p53 (Dohner et al., 2000, Krober et al., 2002, Chen et McMillan, 2008). Gen p53 hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a indukci apoptózy, kterou spouští po identifikaci poškození struktury DNA (Cordone et al., 1998). Delece lokusu p53 (17p13) je jedním z nejsilnějších ukazatelů agresivního průběhu nemoci, rezistenci na chemoterapii a časně smrti (Moreno et Montserrat, 2008, Ure et al., 2009).

1.6.2.1.4. Delece 11q

Další častou chromozomální aberací je delece na dlouhém raménku chromozómu 11 (del 11q), která je také spojena s nepříznivým vývojem nemoci a špatnou prognózou (Dohner et al., 2000, Wiestner et al., 2003, Del Principe et al., 2006, Hallek, 2008, Chen et McMillan, 2008, Montserrat et Moreno, 2008, Ure et al., 2009). Tato delece je spojena se změnami v signálních drahách zprostředkovanými p53 (Chen et McMillan, 2008) a jinými tumor supresorovými geny (*ATM* – ataxia teleangiectasia mutated) (Papajík et al., část I, 2006, Chen et McMillan, 2008). U pacientů se často vyskytují nemutované IgVh geny a vysoká exprese ZAP-70 (Montserrat et Moreno, 2008, Moreno et Montserrat, 2008). Nemocní s touto abnormalitou bývají většinou mladšího věku a stadium choroby bývá pokročilé, choroba rychle progreduje a je potřeba zahájit léčbu velmi brzy (Dohner et al., 2000, Papajík et al., část I, 2006).

1.6.2.1.5. Význam cytogenetických markerů

Identifikace chromozomálních abnormalit a traslokací může pomoci určit stadium nemoci, prognózu a délku přežívání pacientů a může pomoci určit vhodnou léčbu. U většiny nemocných vedou genetické změny ke vzniku a rozvoji agresivnějšího typu choroby a tím k celkovému zhoršení klinického obrazu a přežívání pacientů.

1.6.2.2. Sérové prognostické markery

1.6.2.2.1. beta-2-mikroglobulin

β -2-mikroglobulin je protein o nízké molekulární hmotnosti spojený s HLA komplexem. Jeho hladina je ukazatel progresu nemoci. Vysoká hladina s-B2M je spojena s velkou tumorózní masou a ukazuje na nepříznivou prognózu, zvláště v ranném stadiu nemoci (Constantinides et al., 1985).

1.6.2.2.2. Sérová CD23

Vysoká koncentrace s-CD23 souhlasí s celkovou tumorózní masou, difúzní infiltrací kostní dřeně, krátkým LDT s rychlejší progresí nemoci a má vliv na délku přežívání pacientů. (Moreno et Montserrat, 2008). Jako hraniční hodnota se bere 2700U/ml. Pacienti, kteří mají hladinu sérového CD23 markeru vyšší, mají rychleji progredující nemoc a je u nich potřeba brzy zahájit léčbu (Molica et al., 1996, Hallek, 2008). Zvýšená hladina s-CD23 je významný prognostický marker rychlé progresu zvláště v raných stadiích nemoci (Hallek et al., 1999).

1.6.2.2.3. Thymidin kináza

Sérová thymidin kináza (s-TK) poskytuje prognostické informace nezávislé na Binetově stážovacím systému. Zdá se, že hladina s-TK odráží proliferativní aktivitu tumoru a souhlasí s kratším LDT a difúzní infiltrací kostní dřeně (Hallek et al., 1999, Magnac et al., 2003). Hladina s-TK předpovídá progresi nemoci hlavně u pacientů v ranném stadiu (Moreno et Montserrat, 2008).

1.6.2.3. Molekulární prognostické markery

1.6.2.3.1. ZAP-70

Malé množství genů umožňuje rozlišit mutovanou a nemutovanou CLL. Nejvíce specifický z těchto genů kóduje ZAP-70 (70kDa zeta-associated protein). ZAP-70 je normálně vyjádřený na T a NK buňkách a má rozhodující roli ve vývoji a diferenciaci těchto typů buněk (Crespo et al., 2003, Wiestner et al., 2003, Chen et McMillan, 2008, Moreno et Montserrat, 2008, Ure et al., 2009,). Normální B lymfocyty neexprimují žádný ZAP-70, ale dá se detekovat u B-CLL buněk (Hus et al., 2006, Moreno et Montserrat, 2008).

Hladina exprese ZAP-70 se podle některých autorů (Crespo et al., 2003, Del Principe et al., 2006, Ure et al., 2009) nemění během celé doby onemocnění a ukazuje se jako velmi důležitý prognostický marker, který má sám o sobě prognostickou hodnotu. Nejnovější studie však ukazují, že exprese ZAP-70 se může měnit v průběhu onemocnění a v raném stadiu nemoci mohou CLL buňky produkovat méně ZAP-70 (Morabito et al., 2009). Některé studie neukázali spojitost exprese ZAP-70 s klasickou klinickou klasifikací, včetně klinických stadií podle Raie a Bineta, počtu lymfocytů či zdvojení času lymfocytů (Crespo et al., 2003), jiné naopak prokázali významný vztah vyšší exprese ZAP-70 k pokročilejšímu stadiu podle Raie, k větší lymfadenopatii, splenomegalii a kratšímu LDT (Durig et al., 2003, Wiestner et al., 2003, Del Principe et al., 2006, Hus et al., 2006, Ure et al., 2009). Přesto je zcela prokazatelná souvislost mezi vyšší hladinou exprese ZAP-70 a rychlejší progresí nemoci a kratší dobou přežívání pacientů (Durig et al., 2003, Fernandez et al., 2008, Ure et al., 2009). Leukemické buňky bez IgVh mutací u pacientů s CLL produkují vysokou hladinu ZAP-70, zatímco leukemické buňky s IgVh mutacemi mají velmi nízko a špatně detekovatelnou hladinu ZAP-70. Exprese ZAP-70 má vztah s CD38 antigenem. Oba tyto markery jsou silně vyjádřeny u nemutované CLL a souhlasí s pokročilejším stadiem nemoci (Stevenson et Caligaris-Capio, 2004).

ZAP-70 pozitivita je výrazně spojena s nepříznivým klinickým průběhem. Již samotná přítomnost ZAP-70 je důležitá pro definování špatné prognózy. Různí autoři se však nemohou shodnout na jednotné hranici ZAP-70 positivity (30 % (Crespo et al., 2003, Hus et al., 2006, Morabito et al., 2009), 20% (Durig et al., 2003, Crespo et al., 2003)).

1.6.2.3.2. Mutační status

B-CLL lze rozdělit do dvou různých, klinickým průběhem rozdílně závažných skupin. Skupina případů s nemutovanými Vh segmenty znamenající vznik leukemického CLL klonu z naivních buněk, které neprošli germinálním centrem, s nepříznivou prognózou a tedy s agresivnějším typem nemoci a současně výrazně kratší dobou přežití a skupina případů s mutovanými Vh segmenty znamenající vznik maligního klonu z paměťových B buněk, které prošly aktivací v germinálním centru, vykazující pomalejší progresi nemoci a delší dobu přežití. (Damle et al., 1999, Hamblin et al., 1999, Del Poeta et al., 2001, Hamblin et al., 2002, Ghia et al., 2003, Kuhrová et al., 2004, Chiorazzi et al., 2005, Thorselius et al., 2006, Chen et McMillan, 2008, Fernandez et al., 2008, Moreno et Montserrat, 2008).

Mutační stav variabilního segmentu těžkých řetězců imunoglobulinových genů se během onemocnění nemění a proto je vhodným prognostickým markerem. Lze ho určit již v raných stádiích onemocnění a je vhodným znakem umožňujícím jednoznačné rozdělení pacientů do dvou prognostických skupin a následné určení vhodné léčby (Kuhrová et al., 2006, Moreno et Montserrat, 2008).

Mutace Vh genů jsou detekovány porovnáním DNA sekvence genů v B buňce a odpovídajícími geny v zárodečné linii. Sekvence, která se liší od své analogické zárodečné linie o 2 či více % je definována jako mutovaná (Damle et al., 1999, Kuhrová et al., 2004, Chiorazzi et al., 2005, Chen et McMillan, 2008). Někdo považuje za vhodnější hranici 97% homologie (Krober et al., 2002).

Nápadný rozdíl v klinické odezvě mutovaných a nemutovaných forem imunoglobulinových genů u pacientů s B-CLL je s velikou pravděpodobností způsobený modifikací vazebných vlastností BCR s řadou signálních kompetencí (Kuhrová et al., 2006, Chen et McMillan, 2008). Ferrarini et al. (2006) vysvětluje horší klinický průběh nemutované B-CLL tím, že tento subtyp váže některý přirozeně se vyskytující antigen a uchovává si schopnost expanze po jeho stimulaci a naproti tomu mutovaný subtyp ztrácí schopnost vazby na tento antigen a rovněž nevykazuje signální transdukci z B-buněčného receptoru a jeho schopnost klonální expanze je výrazně snížena (Kuhrová et al., 2006).

1.6.2.3.2.1. Vh1-69, Vh3-21

Mutační status imunoglobulinových genů určuje prognózu pacientů a celkovou dobu přežívání, ale existuje několik výjimek, kdy přítomnost určitého Vh segmentu má špatný prognostický vliv na pacienty a to bez ohledu na mutační status. Těmito výjimkami jsou Vh3-21 a Vh1-69 (Tobin et al., 2002, Thorselius et al., 2006, Panovska-Stavridis et al., 2007, Moreno et Montserrat, 2008).

Pacienti, u kterých je přítomen gen Vh3-21 mají celkově kratší dobu přežití, která je srovnatelná s celkovou dobou přežívání pacientů s nemutovanými imunoglobulinovými geny a to i přesto, že tento gen bývá často mutovaný (63% případů) (Tobin et al., 2003, Thorselius et al., 2006, Panovska-Stavridis et al., 2007, Chen et McMillan, 2008, Montserrat et Moreno, 2008). Studium dalších prognostických markerů bylo objeveno, že Vh3-21+ pacienti vykazují vysokou expresi CD38 a ZAP-70 a to jak v mutovaném, tak nemutovaném případě (Thorselius et al., 2006, Moreno et Montserrat, 2008). Zároveň tito pacienti vykazovali častější přítomnost cytogenetické aberace 11q- oproti ostatním pacientům s B-CLL (Thorselius et al., 2006).

Pacienti, u kterých je přítomen gen Vh1-69 vyžadují časnější léčbu a celková doba přežívání je srovnatelná s pacienty, kteří mají jiné nemutované Vh geny (Panovska-Stavridis et al., 2007). Porovnání případů Vh1-69 s jinými nemutovanými Vh geny neukazuje rozdíl, co se týče věku, pohlaví, počtu lymfocytů a celkové tumorózní masy v době diagnózy a celkový čas bez léčby není rozdílný (Panovska-Stavridis et al., 2007).

1.6.2.3.3. Exprese CD38

CD38 je transmembránový glykoprotein, který funguje jako receptorová molekula způsobující zvýšenou signalizaci BCR (Huttmann et al., 2006). Zvýšená stimulace BCR způsobuje rostoucí počet mitóz a tím nárůst počtu buněk.

Hladina exprese CD38 na povrchu B-CLL buněk je snadno detekovatelná pomocí průtokové cytometrie a mnoho studií se zabývalo jejím vztahem k prognóze pacientů a celkovou dobou přežívání.

Podle počtu CD38⁺ buněk lze pacienty s B-CLL jednoznačně rozdělit do dvou skupin. Velké množství CD38⁺ buněk je spojeno s horší prognózou a celkově kratším časem přežívání (Damle et al., 1999, Del Poeta et al., 2001, Ibrahim et al., 2001, Krober et

al., 2002, Hamblin et al., 2002, Durig et al., 2002, Abousarma et al., 2009). Zároveň je exprese CD38 spojena s přítomností mutovaných/nemutovaných Ig V_H genů. Vysoká exprese CD38 souhlasí s přítomností nemutovaných IgV_H genů s naopak nízká exprese s přítomností mutovaných IgV_H genů (Damle et al., 1999, Ibrahim et al., 2001, Krober et al., 2002, Ghia et al., 2003).

Podobně můžeme objevit vztah i mezi expresí CD38 a ZAP-70. Nízká hladina exprese CD38 souhlasí s nízkou hladinou exprese ZAP-70, zatímco vysoká hladina ZAP-70 byla pozorována u pacientů s vysokým počtem CD38⁺ buněk (Boonstra et al., 2006, Hus et al., 2006).

Porovnáním těchto tří parametrů lze tedy pacienty rozdělit do dvou odlišných skupin podle prognózy a celkové doby přežívání. Vysoká hladina exprese ZAP-70, CD38 a přítomnost nemutovaných IgV_H genů předpovídá špatnou prognózu a kratší délku přežívání pacientů (Hallek, 2008).

Nicméně prognostická hodnota samotné exprese CD38 leukemickými buňkami je značně nejistá. Nejen, že autoři studií navrhuji různé hraniční hodnoty pro určení CD38 pozitivitu (50% (Tinhofer et al., 2006), 30% (Damle et al., 1999, Del Poeta et al., 2001), 28% (Abousarma et al., 2009), 20% (Ibrahim et al., 2001, Durig et al., 2002, Hus et al., 2006), 7% (Krober et al., 2002, Wiesner et al., 2003)), ale také se nemohou shodnout na vhodnosti použití exprese CD38 jako prognostického markeru (Oscier et al., 2002, Ghia et al., 2003, Bilous et al., 2005 říká ne, Damle et al., 1999, Ibrahim et al., 2001, Durig et al., 2002 říká ano) Nejnovější studie ukazují, že hladina exprese CD38 se může v průběhu onemocnění měnit (Moreno et Montserrat, 2008, Morabito et al., 2009, Ure et al., 2009). Nejvíce jsou změny v expresi spojeny s léčbou CLL, což ukazuje, že chemoterapie selektivně zabíjí CD38 buňky (Ibrahim et al., 2001, Hamblin et al., 2002).

1.6.2.3.4 Bcl-2

Gen *bcl-2* se uplatňuje v patogenezi choroby. Buňky B-CLL mají zvýšenou expresi tohoto genu, což vede k inhibici apoptotické smrti a tím k dlouhověkosti patologických lymfocytů a zvyšování celkového počtu lymfocytů v krevním obrazu (Del Poeta et al., 2001, Danilov et al., 2006, Carlucci et al., 2009).

1.6.2.3.5 Micro RNA

Micro RNA umístěné na chromozómu 13 jsou krátké sekvence 19–25 nukleotidů, které působí přes ovlivnění RNA cesty zeslabením cílových genů pomocí inhibice translace proteinů nebo pomocí degradace cílové mRNA (Chen et McMillan, 2008) MiRNAs známé jako *miR15A* a *miR16-1* jsou deletovány u 66% pacientů s B-CLL. Delece těchto genů způsobuje nárůst Bcl-2, inhibitoru apoptózy, a tím funguje jako silný faktor podporující přežívání buněk (Chen et McMillan, 2008) a je spojena s nepříznivou prognózou a horším průběhem CLL (Moreno et Montserrat, 2008).

1.7. Léčba

1. 7. 1. Indikace k zahájení léčby

U pacientů v počátečních stádiích nemoci, kteří jsou bez klinických příznaků, se doporučuje nemocné pouze sledovat („watch and wait“), naopak neodkladně je potřeba zahájit léčbu u pacientů s pokročilejší chorobou. U pacientů se středním rizikem se doporučuje zahájit léčbu jen tehdy, když nemoc progreduje či se objeví zvětšení uzlin a sleziny a jiné příznaky nemoci.

Kritéria pro zahájení léčby B-CLL – souhrn (podle Adam et Vorlíček, 2001)

1. Je přítomen minimálně jeden z následujících klinických symptomů:
 - a) úbytek hmotnosti 10% za půl roku
 - b) značná malátnost a slabost, zabraňující ve vykonávání běžné denní činnosti a práce
 - c) neinfekční teploty trvající déle než 2 týdny
 - d) noční pocení bez přítomnosti infekce
2. Postupné zhoršování krvetvorby, rozvoj nebo zhoršování anémie nebo trombocytopenie
3. Autoimunitní anémie nebo trombocytopenie neúspěšně léčená kortikosteroidy
4. Masivní splenomegalie nebo progresse splenomegalie
5. Masivní pakety uzlin nebo progresse lymfadenopatie
6. Progrese lymfocytózy se vzestupem počtu lymfocytů o >50% za 2 měsíce nebo předpokládaný zdvojovací čas kratší než 6 měsíců

1. 7. 2. Léčba nemocných s pokročilým onemocněním

1.7.2.1. Léčebná strategie

Klasickými léky jsou chlorambucil a kortikosteroidy nebo polychemoterapeutické režimy a purinová analoga. U pacientů mladších 60 let by se mělo zvážit použití agresivnějších postupů zahrnující léčbu purinovými analogy, monoklonálními protilátkami a vysokodávkovanou chemoterapií s transplantací krvetvorné tkáně.

1.7.2.2. Kortikosteroidy

Kortikosteroidy indukují v jádře lymfocytů apoptotickou smrt buňky, ale jejich účinnost je u B-CLL omezená. Vysoké dávky kortikosteroidů jsou používány v terminálních fázích nemoci, kdy je fyziologická krvetvorba snížena lymfoidní infiltrací (Papajík et al., část III, 2006).

1.7.2.3. Alkylační cytostatika

Klasickým a již dlouhá léta používaným lékem pro chronickou lymfatickou leukemii je chlorambucil. Léčebné cykly se opakují až do dosažení maximální léčebné odpovědi, obvykle 8–12 měsíců. Lék se používá především k léčbě starších pacientů s progredující chorobou (Papajík et al., část III, 2006).

Léčebná kombinace CHOP (cyklofosfamid, adriamycin, vinkristin a prednison) dosahuje léčebné odpovědi rychleji a také počet léčebných odpovědí je při této léčbě vyšší než dosahuje léčba chlorambucilem (Papajík et al., část III, 2006).

1.7.2.4. Radioterapie

Část nemocných má potíže způsobené splenomegalií. Standardním postupem k odstranění těchto potíží je cílená radioterapie na slezinu. Méně často používanou alternativou ozařování sleziny je splenektomie (Papajík et al., část III, 2006).

1.7.2.5. Purinová analoga

Novými léky pro léčbu chronické lymfatické leukemie jsou purinová analoga, která mají schopnost navodit remisi při rezistenci na alkylační cytostatika, musí však být podány při prvních známkách rezistence, neboť v opačném případě může dlouhodobá léčba

alkylačními cytostatiky poškodit zbývající funkční kmenové hematopoetické buňky (Papajík et al., část III, 2006).

Na rozdíl od konvenčních cytostatik jsou purinová analoga účinná jak na proliferující buňky, tak i na elementy v klidové fázi buněčného cyklu. Fludarabin je v současnosti nejúčinnější látkou v léčbě B-CLL (Papajík et al., část III, 2006).

1.7.2.6. Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky alemtuzumab (anti-CD52) a rituximab (anti-CD20 protilátka) lze použít i u pacientů, kteří nebyli dosud léčeni, a v kombinaci s purinovými analogy lze prodloužit přežití nemocných (Papajík et al., část IV, 2007).

Antigen CD52 se vyskytuje na povrchu všech fyziologických B-lymfocytů, nenachází se na kmenových buňkách krvetvorby, ale zůstává na nádorových B buňkách. Alemtuzumab se specificky váže na nádorové B-buňky, což umožní jejich následnou eliminaci a snížení počtu fyziologických lymfocytů v periferní krvi (Papajík et al., část IV, 2007).

Antigen CD20 se vyskytuje na povrchu B-lymfocytů ve všech stupních jeho vývoje kromě plazmocytů, ale není přítomen na kmenových buňkách krvetvorby. Dobrých výsledků v léčbě se dosahuje při kombinaci chemoterapie s rituximabem (Papajík et al., část IV, 2007).

1.7.2.7. Transplantace

Alogenní transplantace se považuje za vhodnou léčbu pro pacienty s pokročilejší chorobou, špatnou prognózou, u nichž se nepředpokládá úspěch léčby vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací. Alogenní transplantace představuje zatím jedinou metodu, která za optimálních podmínek může B-CLL úplně vyléčit.

Autologní transplantace u B-CLL přinášejí nejlepší výsledky, jsou-li prováděny po předchozí léčbě ve fázi minimální nádorové masy (Papajík et al, část V, 2007).

1.7.2.8. Podpůrná léčba

K podpůrné léčbě patří přesná diagnostika a aktivní léčení infekčních komplikací antibiotiky, antimykotiky a antivirotiky.

1.8. Praktický význam prognostických faktorů

1. 8. 1. Klasické prognostické markery

Oba stážovací systémy podle Raie a Bineta vycházejí z velmi jednoduchých a snadno dostupných klinických a laboratorních parametrů a vypovídají o přežívání pacientů. Kromě základních klinických prognostických faktorů je řada dalších jednoduchých faktorů spojených se špatnou prognózou (pokročilý věk, mužské pohlaví, vysoká koncentrace lymfocytů, difuzní infiltrace kostní dřeně,...). Dlouhou dobu pro běžnou klinickou praxi u pacientů s CLL postačovalo základní klinické a laboratorní vyšetření (Mayer et al., 2007).

1. 8. 2. Cytogenetika

Dnes je cytogenetické vyšetření pomocí FISH sond součástí hodnocení rizika nemocných s CLL. Patologické cytogenetické nálezy jsou velmi časté již u nově diagnostikovaných pacientů a s přibývajícím dobou od stanovení diagnózy se mohou objevovat další cytogenetické změny. Přítomnost cytogenetických změn má vliv na celkové přežití pacienta a na přežití bez progresu choroby. Pro využití cytogenetických změn pro klinické účely je potřeba dobře vyhodnotit, v kolika procentech buněk se změny vyskytují, zdali jsou jen na jednom či na obou chromozómech a jaký to má pro pacienta význam (Mayer et al., 2007).

1. 8. 3. Molekulární prognostické markery

Mutační stav je významný prognostický ukazatel, který je nezávislý na klinickém stadiu choroby.

U proteinu ZAP-70 představuje největší praktický problém metodika jeho stanovení, protože ZAP-70 je kromě B-CLL buněk silně exprimován také na T-buňkách a proto se může vyskytovat falešná pozitivita. Nicméně ho lze z hlediska určení léčby, stejně jako expresi CD38, brát jako doplňující informaci k mutačnímu stavu imunoglobulinových genů (Mayer et al., 2007).

1. 9. Více klonální přestavby

Během zrání lymfocytů dochází k přestavbě VDJ genů pro těžký řetězec imunoglobulinu. V případě, že je první alela pro těžký imunoglobulinový řetězec přestavena mimo čtecí rámec a z odpovídající mRNA nemůže vzniknout kompletní polypeptid, proces přestavby se přesune na druhou alelu. Pokud je první přestavba produktivní, proces alelické exkluzi znemožní zahájení přestavby na druhé alele.

V některých případech však bylo detekováno 2 a více buněčných klonů u jednoho pacienta s B buněčným lymfoproliferativním onemocněním. Tyto případy lze rozdělit na několik situací (Cerny et al., 2004, Chang et al., 2006):

3. pacienti s CLL mohou mít buněčný klon produkující na buněčném povrchu 2 rozdílné imunoglobulinové molekuly (nedošlo k alelické exkluzi a došlo k přestavbě imunoglobulinových genů na obou alelách), tento jev je častější u CLL buněk než u buněk normálních
3. pacienti mají dvě IgH přestavby, ale pouze jedna přestavba je produktivní a je translatována ve funkční imunoglobulinový protein
3. lymfomy dvojí morfologie a biklonální leukemie reprezentují situaci, kdy pacienti mají dva maligní klony a oba klony produkují rozdílnou imunoglobulinovou molekulu

Biklonální CLL ještě není dobře charakterizována, protože jen méně než 5% chronických B buněčných lymfoproliferativních onemocnění v leukemické fázi má více než jeden klon (Chang et al., 2006). K maligním transformacím může docházet u dvou nezávislých B buněk během nebo až po vývoji v zárodečném centru. V případě biklonální lymfoproliferativní poruchy je potřeba si položit otázku, zda se jedná opravdu o biklonální průběh nebo jestli jeden klon reprezentuje subklon druhého.

U pacientů s CLL s dvěma B buněčnými klony může být onemocnění rozděleno do dvou podskupin – CLL+CLL a CLL+non-CLL, kdy bylo ukázáno, že pacienti s CLL a non-CLL populací B buněčných klonů vyžadují léčbu během prvním 18 měsíců výrazně častěji, než pacienti s pouze CLL nebo CLL+CLL (Chang et al., 2006).

Černý et al. (2004) se zajímali, zda pacienti, kteří mají dvě IgH přestavby mají stejné klinické charakteristiky a průběh nemoci jako pacienti s pouze jednou přestavbou, nezjistili však výrazné rozdíly mezi mono- a biIgH pacienty. Odhadovaná doba progresu monoIgH pacientů nebyla výrazně rozdílná od biIgH pacientů a ani celková doba přežívání nebyla u obou skupin rozdílná. Zaznamenali pouze větší množství dalších onemocnění u

bialelických pacientů než u pacientů monoalelických (Cerny et al., 2004).

Zdá se tedy, že přítomnost bialeické IgH přestavby nemá žádný vliv na prognózu nemoci, nicméně tyto závěry by stály za další diskuzi a prozkoumání.

1. 10. Cíle práce

- u pacientů s diagnózou CLL stanovit klonalitu populace lymfocytu (ověření diagnózy)
- u vzorku s maligním klonem určit konkrétní rodinu přestaveného IgVh genu
- stanovit rozsah hypermutací
- v případě, že budou k dispozici relevantní klinická data, pokusit se určit vztah mutačního statusu a dalšího klinického vývoje pacienta

2. Materiál a metody

2. 1. Získávání vzorků

Vzorky periferní krve odebrané pacientům s diagnostikovanou B-buněčnou chronickou lymfatickou leukemií jsou zasílány na naše pracoviště (Laboratoř molekulární biologie a genetiky, Nemocnice České Budějovice a.s.) z hematologických pracovišť ze spádové oblasti Jižních Čech, kde jsou vyšetřeny a je u nich stanoven mutační status genů pro těžké řetězce imunoglobulinů.

Soubor našich vzorků zahrnuje pacienty od roku 2006 do února 2010 (příloha 3). V tomto období bylo celkem přijato k vyšetření mutačního statusu 230 vzorků, u 172 vzorků byla provedena fragmentační analýza a v případě monoklonality či biklonality vyšetřen mutační status. U zbylých vzorků nebylo po domluvě s lékařem či pro nedostatek materiálu vyšetření prováděno.

Celkem bylo vyšetřeno 88 mužů a 56 žen v různém stadiu onemocnění, průměrný věk vyšetřených pacientů byl 70 let.

2.2. Metodika stanovení mutačního statusu variabilního segmentu těžkého řetězce imunoglobulinů

Izolovanou RNA nejprve přepíšeme reverzní transkripcí do odpovídající cDNA, z té specifickou amplifikací namnožíme úseky přestavěného těžkého řetězce imunoglobulinových genů. Fragment DNA vytvoří po elektroforetické separaci v agarózovém gelu proužek identických molekul na slabém pozadí fragmentů DNA ze zdravé buněčné populace. Tento specifický produkt přečistíme a poté sekvenujeme. Následně porovnáme sekvenci s databázemi a vyhodnotíme mutační stav pro účely určení prognózy pacienta.

2.2.1. Izolace RNA z periferní krve

- materiál: kit QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) – obsahuje pufrы EL, RTL, RW1, RPE, RNAase free water
- centrifuga
- 70% ethanol
- 14,3 M β -mercaptoethanol

Periferní krev byla centrifugována (500 g/ 10 min/ 4°C), poté byla opatrně odsáta peleta leukocytů na rozhraní plasmы a červené složky krve a přenesena do nové zkumavky. Pokud je peleta leukocytů příliš tenká nebo nezřetelná, je možné odebrat celou červenou složku krve a pracovat s ní. K odebraným leukocytům bylo přidáno pěti násobné množství EL pufru, zkumavka byla opatrně promíchána a inkubována 15min při 4°C. Během inkubace byl obsah zkumavky dvakrát krátce vortexován. Po lyzi erytrocytů zkumavku opět centrifugovat (500 g/ 10 min/ 4°C), odsát supernatant a sediment leukocytů ještě jednou promýt 2 ml EL pufru. Zkumavku centrifugovat (500 g/ 10 min/ 4°C) a zcela odsát supernatant.

Po lyzi erytrocytů a jejich odmytí přidat k sedimentu leukocytů 600 μ l RTL pufru s mercaptoethanolem a zlyzovat leukocyty. Pokud je lyzát příliš viskózní, přidat dalších 600 μ l RTL pufru s mercaptoethanolem.

Napipetovat 600 μ l lyzátu do QIAshredder kolonky a centrifugací (13000 g/ 2min) homogenizovat. Do sběrné zkumavky s homogenizovaným lyzátem přidat 600 μ l 70% ethanolu a promíchat opakovaným pipetováním cca 30 sekund.

Lyzát s ethanolem přenést na QIAamp kolonku a centrifugovat (12000 g/ 1 min). Nyní máme RNA navázanou na kolonku a je potřeba ji promýt. V prvním kroce přidat 700 μ l pufru RW1 a centrifugovat (12000 g/ 1 min), následně přidat 500 μ l pufru RPE a opět centrifugovat (12000 g/ 1 min). Promytí RPE puftrem opakovat a nakonec suchou kolonku centrifugovat (13000 g/ 1 min) aby došlo k úplnému odstranění všech promývacích pufrů.

Pro uvolnění izolované RNA ze suchého filtru kolonky použít 50 μ l vody bez RNAase (napipetovat přímo na filtr) a následně kolonku centrifugovat (13000 g/ 1 min).

2.2.2. Reverzní transkripce

- materiál: kit SuperScript III First Strand (Invitrogen)
cycler

Nejprve připravit master mix 1 na denuraci, přidat ho ke vzorku (1,5 μ l RNA) a nechat ho denaturovat při 65°C 5min. Po denuraci vzorku namíchat master mix 2.

Master Mix 1

dNTPs (10mM)	1 μ l
random hexamers (50n ng/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	6,5 μ l

Master Mix 2

10xRT pufr	2 μ l
25mM MgCl ₂	4 μ l
0,1 M DTT	2 μ l
RnaseOUT™ 40U/ μ l	1 μ l
SuperScript™ III RT 200U/ μ l	1 μ l

Master mix 2 přidat ke zdenaturované RNA s nukleotidy a primery a v cycleru nechat proběhnout reverzní transkripci a vytvořit cDNA.

reakční schéma:

1.25°C 10 min

2.50°C 50 min

3.85°C 5 min

Po doběhnutí reakce přidat ke vzorku 1 μ l RNase H (2U/ μ l) a inkubovat 20min. při 37°C.

2.2.3. PCR

- materiál: PPP master mix (75mM Tris-HCl ph 8,8, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5mM MgCl₂, 200μM dATP, 200μM dGTP, 200μM dTTP, 200μM dCTP, 2,5U Tag purple DNA polymeráza) (TopBio)
primery (Invitrogen)
cycler

Vh geny jsou rozděleny do sedmi rodin, jejichž členové mají značnou sekvenční homologii. Pro určení sekvence Vh segmentu a tím i mutačního statusu u vyšetřovaného pacienta je v prvním kroku potřeba identifikovat, do jaké rodiny Vh segment patří. Proto musíme pro každý vzorek připravit 7xPCR reakci s použitím různých primerů (primer Vh1,7; Vh2; Vh3A; Vh3B, Vh4; Vh5; Vh6). Rodiny 1 a 7 jsou značně podobné a používáme pro ně jen jeden společný primer, naopak rodina 3 je velmi rozsáhlá s nižší sekvenční homologií a proto je třeba použít dva rozdílné primery. Pro každý vzorek ještě namíchat jednu PCR reakci s použitím značeného Jh primeru (Jh primer je společný všem rodinám) – produkt této PCR reakce se používá na fragmentační analýzu. K připravenému master mixu přidat 1μl cDNA a nechat v cycleru proběhnout program.

Master Mix 3

PPP master mix	12,5 μl
primer Vh 10μM	1 μl
primer Jh 10μM	1 μl
H ₂ O	9,5 μl

Master Mix na fragmentační analýzu

PPP master mix	12,5 μl
primer Frc 10μM	1 μl
primer Jh značený 10μM	1 μl
H ₂ O	9,5ul

reakční schéma

- 1.denaturace 94°C 3min
 - 2.denaturace 94°C 45s
 - 3.annealing 64°C 30s
 - 4.elongace 72°C 30s
 - 5.extenze 72°C 10min
 - 6.chlazení 4°C
- kroky 2–4 opakovat 24x

2.2.4. Elektroforéza

- materiál: TBE pufr (5,4g Tris, 2,75 g kyselina boritá, 2ml 0,5M EDTA pH 8,0,
destilovaná voda do 1000 ml)
ethidium bromid (0,625mg/ml)

Po specifickém namnožení DNA provést identifikaci produktů na 2% agarózovém gelu (2% agarózy v TBE pufru) obsahujícím 2 µl ethidium bromidu. Elektroforézu nechat probíhat po dobu 90–120 min při 120V.

2.2.5. Fragmentační analýza

- materiál: HiDi formamid (Applied Biosystems)
LIZ standard (Applied Biosystems)
sekvenátor ABI PRISM 310

Fragmentační analýza se provádí pro stanovení klonality populace lymfocytu metodou kapilární elektroforézy na přístroji ABI 310. Na fragmentační analýzu použít značený produkt PCR reakce a podle intenzity tento produkt naředit. Vhodného množství DNA pro fragmentační analýzu lze také dosáhnout změnou doby nástřiku. 1µl naředěného značeného produktu smíchat s 20 µl HiDi formamidu a 0,2 µl LIZ standartu a denaturovat při 95°C/ 3 min. Poté pustit fragmentační analýzu na ABI 310.

2.2.6. Přečištění PCR produktu

- materiál: kit MinElute PCR Purification (Qiagen)

centrifuga

Před sekvenací genu je potřeba vybraný PCR produkt přečistit od zbytků primerů a nukleotidů nespotrebovaných při reverzní transkripci. Přečištění probíhá přes MinElute kolonky podle protokolu výrobce.

2.2.7. Příprava vzorku na sekvenaci

- materiál: kit Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

kolonky SigmaSpin Post-reaction Clean-Up (Sigma-Aldrich)

primery

HiDi formamid (Applied biosystems)

centrifuga

cycler

sekvenátor ABI PRISM 310

Pro každý vložek připravit 2 sekvenační reakce obsahující deoxynukleotidy a příslušný primer. Gen sekvenujeme z obou stran, proto kromě Vh primeru, určeného podle vyhodnocení výsledku elektroforézy použijeme do druhé reakce Jh primer. Poté nechat v cycleru proběhnout program.

Master Mix sekvenace

Ready Reaction Premix	4 µl
BigDye Sequencing Buffer	2 µl
primer	0,75 µl
H ₂ O	12,7 µl
DNA	1 µl

reakční schéma

- 1.denaturace 96°C 2min
 - 2.denaturace 96°C 10s
 - 3.annealing 62°C 10s
 - 4.elongace 60°C 4min
 - 5.extenze 60°C 10min
 - 6.chlazení 4°C
- kroky 2–4 opakovat 30x

Po proběhnutí sekvenační reakce je potřeba značenou DNA zbavit zbytků chemikálií nepoužitých pro reakci pomocí kolonek Sigma podle protokolu výrobce.

Celý objem přečištěné reakce denarovat s 20 µl HiDi formamidu při 95°C/ 3 min. Pustit sekvenaci na ABI 310. Z zanalyzovaných sekvencí složit contig pomocí SeqAssem.exe a porovnat s databázemi.

IMGT (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg)

IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)

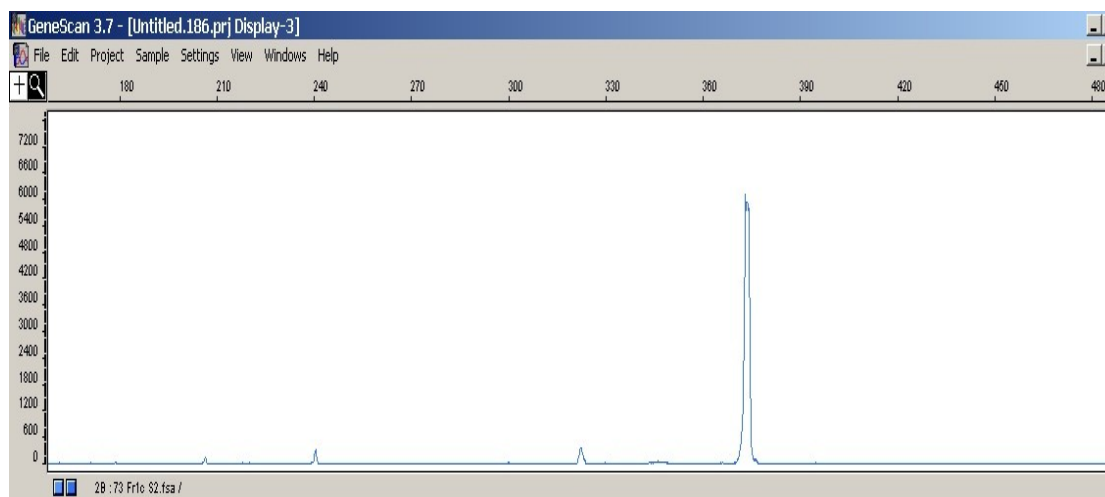
3. Výsledky

3. 1. Stanovení klonality lymfocytů

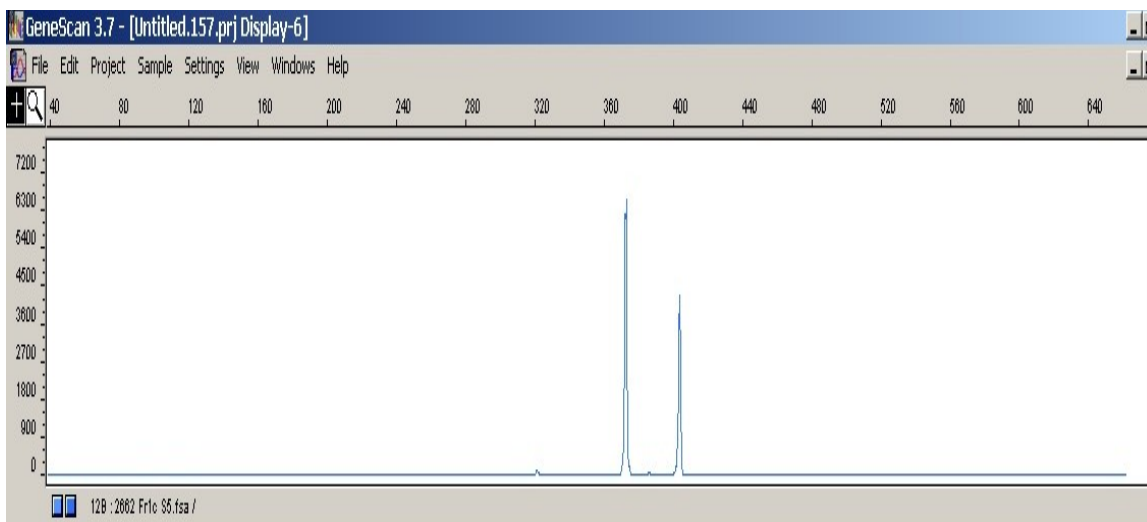
Stanovení diagnózy B-CLL není vždy jednoznačné a proto je prvním krokem po zpracování vzorku krve pacienta potvrzení této diagnózy pomocí fragmentační analýzy. Na základě výsledků fragmentační analýzy lze prvotní diagnózu potvrdit či vyvrátit. B-CLL je způsobena akumulací a proliferací jednoho jediného klonu B-lymfocytů. V případě, že se pravděpodobně opravdu jedná o B-CLL, vzorek obsahuje pouze jeden klon buněk (obr. 3) a my dále pokračujeme ve zpracování a určování mutačního stavu. V případě, že fragmentační analýza vychází polyklonální (obr. 5), nejedná se pravděpodobně o B-CLL, ale jiné lymfoproliferativní onemocnění. V tomto případě nemůžeme stanovit mutační status, protože ve vzorku není přítomen pouze jeden klon buněk. Ošetřujícímu lékaři však doporučujeme pozdější opakovaný odběr vzorku pro včasné zachycení vznikající B-CLL.

Speciální případy zahrnují biklonalitu (obr. 4) kdy na fragmentační analýze vidíme dva výrazné izolované klony buněk. V těchto případech postupujeme jako u monoklonálního pacienta a pro každý klon zvlášť určujeme jeho mutační status.

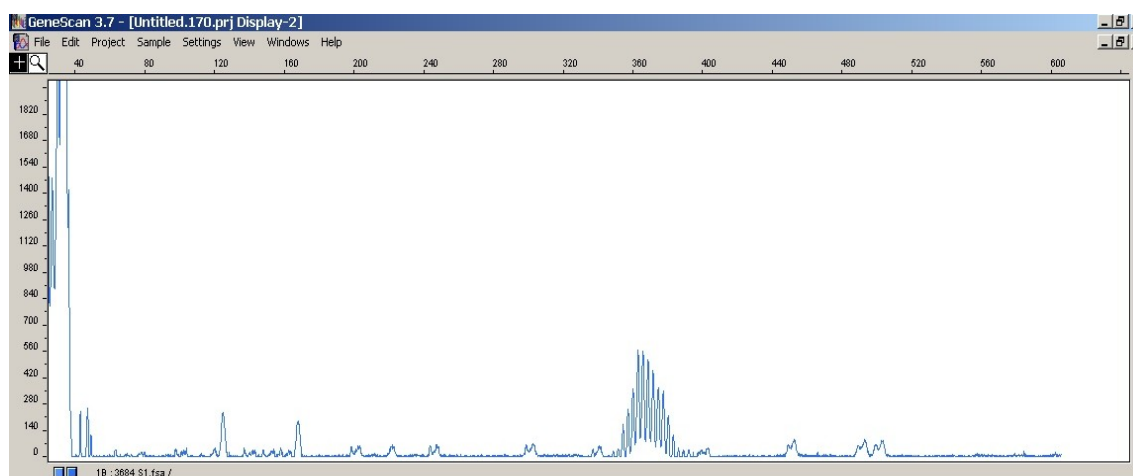
Aby se jednalo o jeden maligně zvrhlý klon buněk, je potřeba, aby na elektroforetogramu byl videt jeden úzký pík, který převyšuje ostatní píky minimálně třikrát.



Obr. 3: **Výsledek fragmentační analýzy – monoklonalita.** Na elektroforetogramu vidíme jeden izolovaný pík výrazně převyšující ostatní píky.

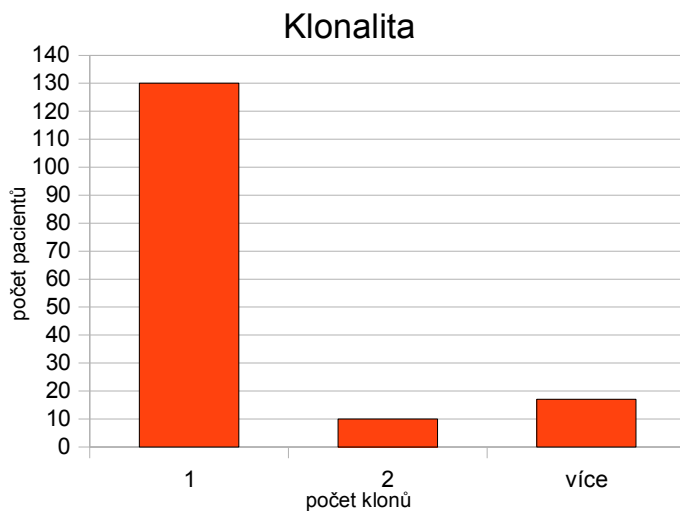


Obr. 4: **výsledek fragmentační analýzy – biklonalita.** Na elektroforetogramu vidíme dva izolované píky výrazně převyšující ostatní.



Obr. 5: **Výsledek fragmentační analýzy – polyklonalita.** Na elektroforetogramu nelze identifikovat jeden izolovaný pík převyšující ostatní píky alespoň třikrát.

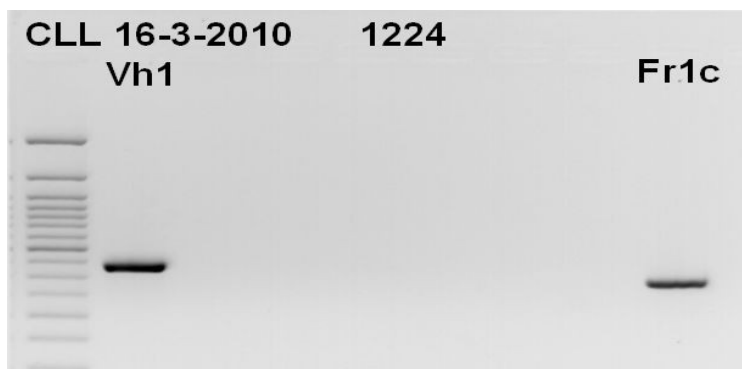
Většina pacientů vyšetřená v naší laboratoři je monoklonální. Jen v 17 případech jsme určili polyklonalitu a doporučili nové vyšetření (obr. 6). U tří z těchto opakovaně vyšetřených pacientů jsme při druhém vyšetření zjistili monoklonalitu a určili mutační status. U těchto pacientů mohla být polyklonalita způsobena infekcí či jiným onemocněním zvyšujícím počet lymfocytů.



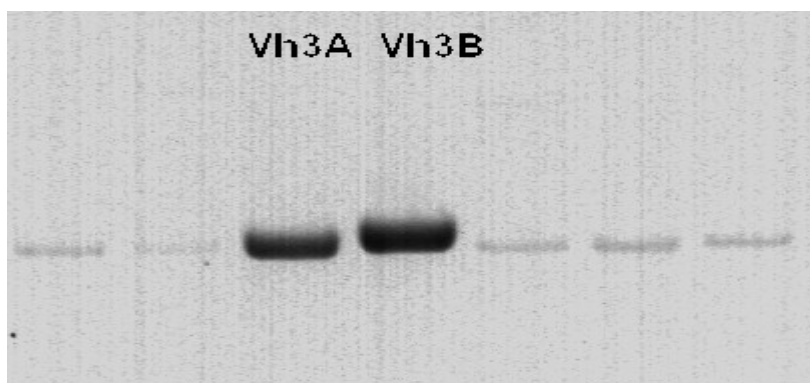
Obr.6: **Výsledky fragmentační analýzy.** Srovnání počtu pacientů s 1, 2 a více klony buněk

3. 2. Stanovení rodiny přestavěného IgVh genu

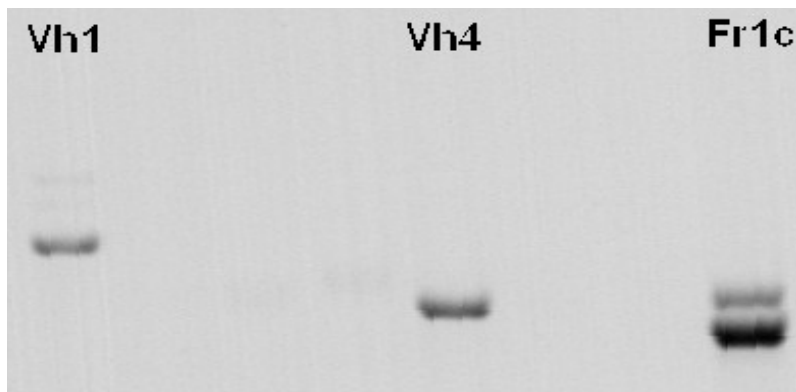
Po specifickém namnožení DNA s primery pro jednotlivé rodiny a provedení identifikace produktů pomocí elektroforézy můžeme stanovit konkrétní rodinu přestavěných IgVh segmentů. Pokud se jedná o monoklonálního pacienta (obr. 7, obr. 8), na gelu vidíme pouze jeden specifický produkt PCR (v případě rodiny 3 mohou proužky dva díky použití dvou různých primerů). Při biklonalitě (obr. 9) se DNA amplifikuje se dvěma primery a vzniknou dva produkty PCR a při polyklonalitě (obr. 10), kdy je ve vzorku obsaženo mnoho různých klonů buněk vzniká několik PCR produktů.



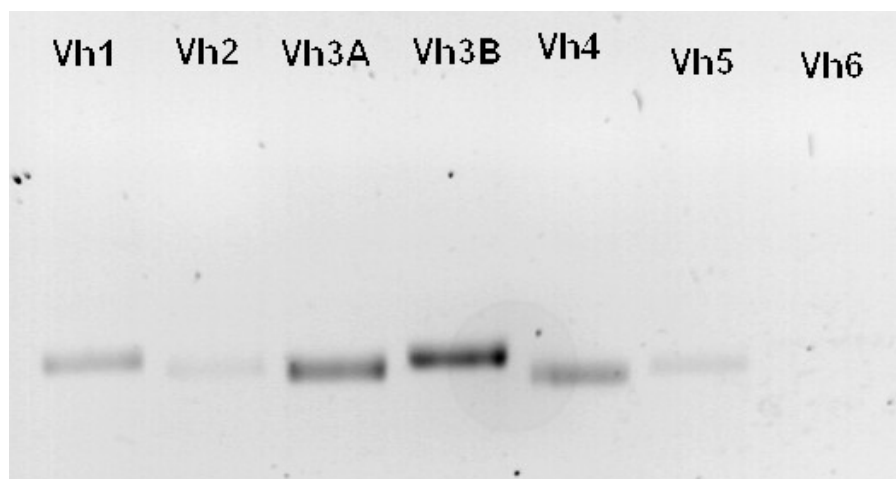
Obr. 7: **Výsledky elektroforézy – monoklonalita.** Pacient produkuje pouze jeden klon buněk produkující funkční imunoglobuliny, přestavěné geny patří do rodiny Vh1. Fr1c – specifický produkt PCR vzniklý použitím značeného Jh primeru.



Obr. 8: **Výsledky elektroforézy – monoklonalita.** Pacient produkuje pouze jeden klon buněk produkující funkční imunoglobuliny, přestavěné geny patří do rodiny Vh3.

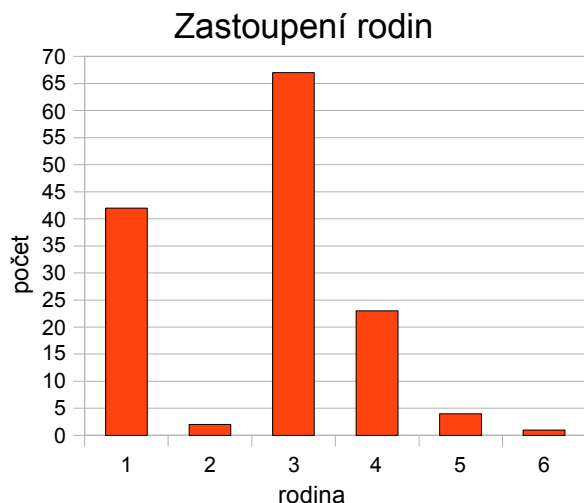


Obr. 9: **Výsledky elektroforézy – biklonalita.** Pacient produkuje dva klon buněk produkující imunoglobuliny, přestavěné geny patří do rodiny Vh1 a Vh4. Biklonalitu potvrzuje i produkt PCR se značeným primerem (označen Fr1c), který se na gelu rozděluje na dva různě velké fragmenty.



Obr.10: **Výsledky elektroforézy – polyklonalita.** Pacient produkuje několik klonů buněk, které tvoří specifické produkty s primery pro několik rodin najednou

Nejčastěji zastoupenou rodinou ve skupině našich vzorků je rodina Vh3 (67 případů) a rodina Vh1 (42 případů). Rodina Vh2, Vh5 a Vh6 je zastoupena pouze ojediněle (Vh2 – 2 případy, Vh5 – 4 případy a Vh6 – 1 případ) (obr. 11).



Obr.11: Četnost výskytu jednotlivých rodin u pacientů s vyšetřeným mutačním statusem

3. 3. Stanovení rozsahu hypermutací

Po zanalyzování a upravení sekvencí přestavěných imunoglobulinových genů jsem tyto sekvence porovnávali s databázemi IMGT/V-QUEST (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg) a IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), abychom určili o jaký segment pro těžké řetězce imunoglobulinových genů se jedná a jeho homologii se zárodečnou linií a tím mutační status. Získanou sekvenci porovnááme s oběma databázemi, protože někdy se výsledná sekvenční homologie u databází liší.

Výstupem z databáze určíme, zda se jedná o produktivní přestavbu a klon buněk tvoří funkční imunoglobuliny, určíme která je odpovídající zárodečná linie IgVh segmentů pro náš vzorek a sekvenční homologii našeho vzorku se zárodečnou linií (obr.12, obr. 13). Zároveň vidíme sekvenci, kterou s databází porovnááme a změny, které naše sekvence oproti zárodečné linii obsahuje.

Porovnáním s databází můžeme odhalit i delší delece/inzerce, které sekvence obsahuje. Při porovnávání jsou tyto delece/inzerce odstraněny a určena homologie bez této delece/inzerce.

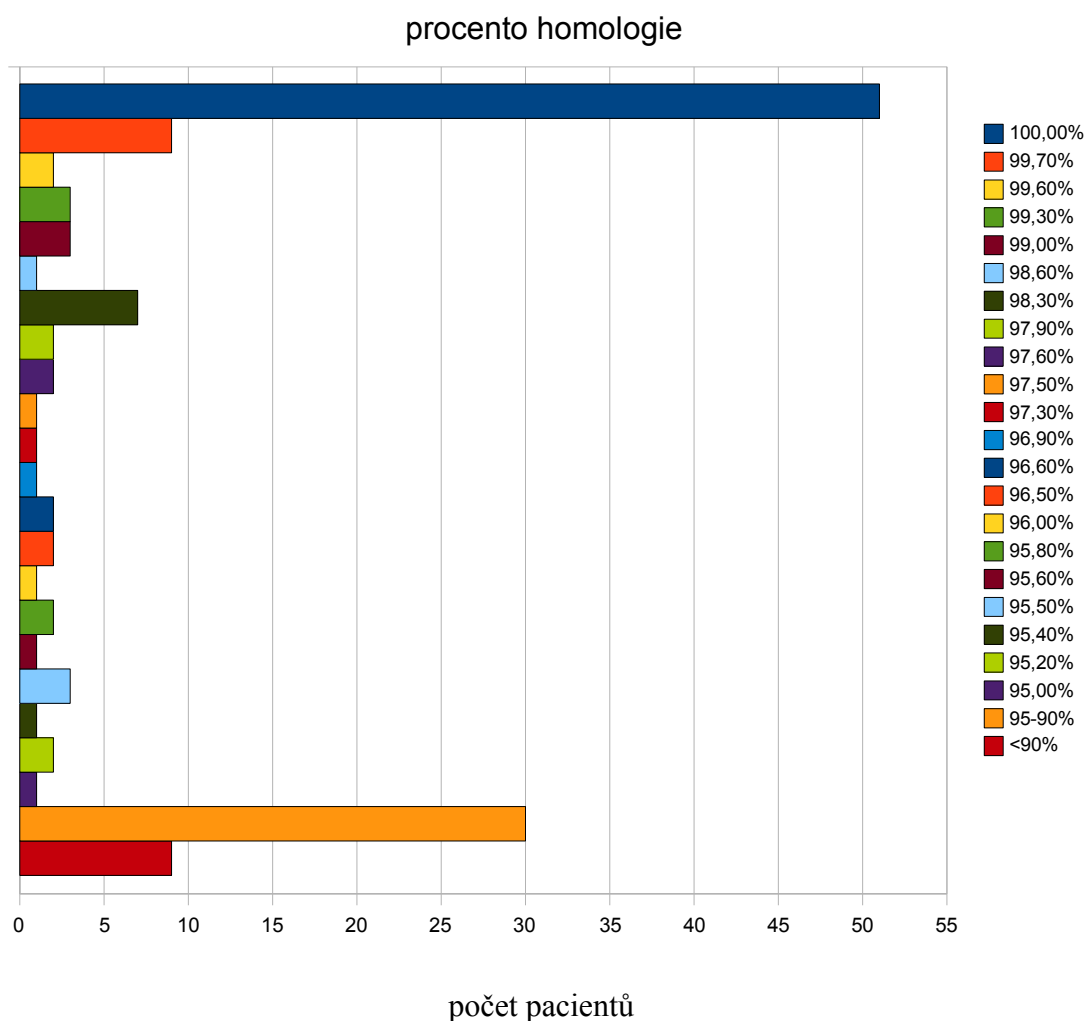
Sequence number [redacted] 7_JH_VH4

Sequence compared with the human IG set from the IMGT reference directory

```
>5377_JH_VH4
ttgctcccaaatggggtcctgtcccagttccaactgcagcagtggggcccaggaactgtt
gaagcctcggagaccctgtccctcaactgcctgtgtatgttgggtccttcaatgaata
ttactggagctggatccgcaactcccagggaaagggctggagtggttgggaaatcac
tcaactgtggaaccgcaactacagccctccctcaagagtgagtggtccatccgtgga
caagtccaagaaccagttctccctgaggtgagctctgtcacccgcccggacacggctgt
atattctgtgcgagagcccggtctccgactacggtgactacgccactattacta
tgggatggaagctctggggccaggggaccacggtcacctctccttcaggta
```

Result summary:	Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	IGHV4-34*01 or IGHV4-34*12	score = 1204	identity = 91.58% (261/285 nt)
J-GENE and allele	IGHJ6*02	score = 220	identity = 83.87% (52/62 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	IGHD4-17*01	D-REGION is in reading frame 2	
[CDR1-IMGT.CDR2-IMGT.CDR3-IMGT] lengths and AA JUNCTION	[8.7.21]	CARGPRSPDYGDIYAHYYYGMVW	

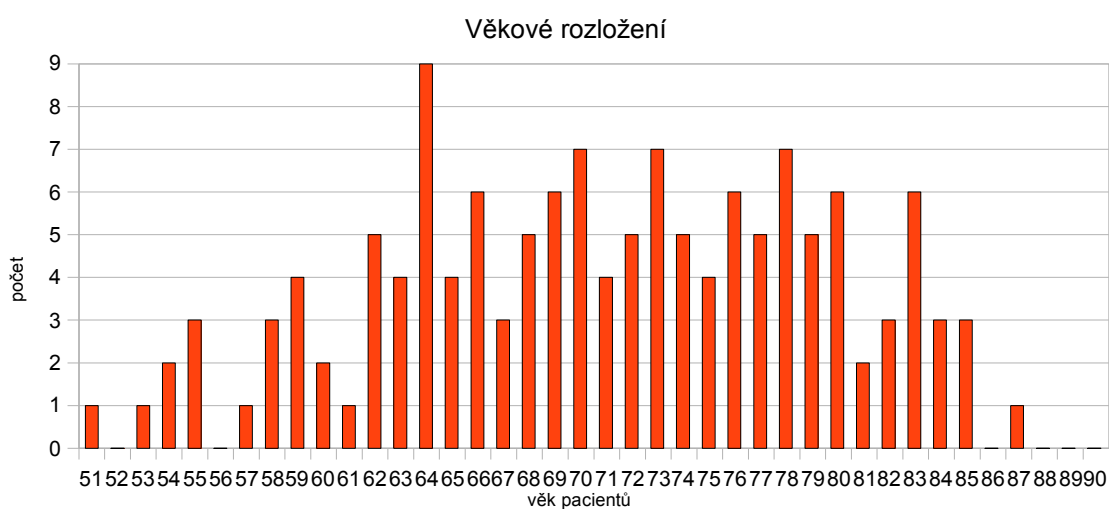
Obr. 12: Výstup z databáze. Pro určení prognózy pacienta je důležitá produktivita/neproduktivita přestavby a její sekvenční homologie se zárodečnou linií (žluté písmo), případně příslušná zárodečná linie (označená šipkou)



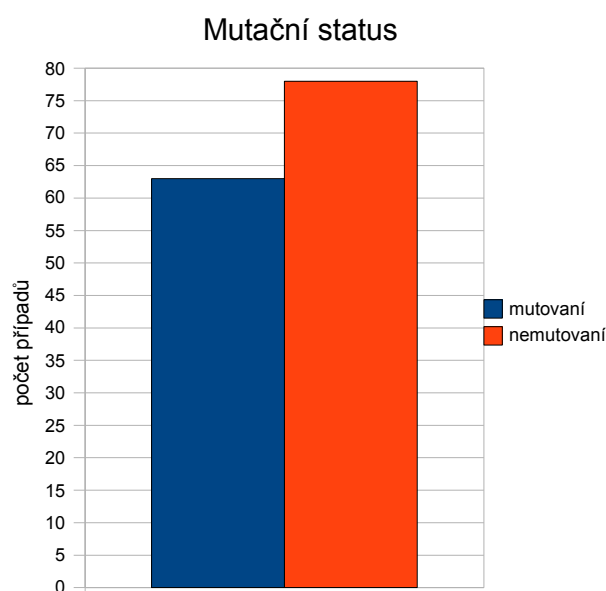
Obr. 13: Procento homologie s odpovídající zárodečnou linií

3. 4. Klinické výsledky

V naší laboratoři jsme vyšetřili 172 pacientů s diagnózou B-CLL (příloha 3). Poměr mužů a žen byl 3:2, věkové rozpětí bylo 50-90 (obr. 14). U pacientů s vyšetřeným mutačním statusem byla v 78 případech diagnostikována nemutovaná forma CLL a v 63 případech mutovaná forma CLL (obr. 15). V 17 případech jsme diagnostikovali polyklonalitu a ošetřujícímu lékaři doporučili opakovaný odběr vzorku později (obr. 6).



Obr. 14: Věkové rozložení pacientů přijatých k vyšetření mutačního statusu



Obr. 15: Porovnání počtu případů nemutované a mutované CLL

4. Diskuze

Chronická lymfatická leukemie je onemocnění velmi různorodé a určení její diagnózy a následné prognózy pacientů není jednoduché. Někteří pacienti nevyžadují léčbu dlouhou dobu po stanovení diagnózy B-CLL, u jiných naopak nemoc velmi rychle progreduje a je potřeba zahájit léčbu co nejdříve. V dnešní době se daří pacienty diagnostikovat ve stále časnějších stádiích, a proto je důležité stanovit nejen diagnózu, ale i prognózu. Na základě prognostických markerů lze předpovídat vývoj onemocnění a určit vhodnou léčbu či zabránit podávání nevhodné, poměrně agresivní léčby pacientům.

V současné době je B-CLL nevyléčitelné onemocnění, ale volbou vhodné terapie lze život pacientů prodloužit a zkvalitnit. Jedinou možností vyléčení je alogenní transplantace krvetvorných buněk, to je však spojeno s vysokou úmrtností pacientů a je limitována vyšším věkem pacientů.

Pro určení prognózy stále zůstává jako prvotní a nejjednodušší způsob využití stážovacích systémů. Ty nám však poskytují prognostické informace až v případě pokročilejšího stadia nemoci. A protože se mnoho pacientů diagnostikuje již v raném stadiu onemocnění, nabývají v dnešní době na významu biologické prognostické markery, které jsou u pacienta po celou dobu onemocnění neměnné a přítomné už od začátku onemocnění.

Celosvětově proběhlo mnoho studií, které se zabývaly právě těmito prognostickými markery. Mezi ty nejčastěji zkoumané a považované za nejdůležitější patří cytogenetické odchylky a molekulární markery – mutační status IgVh, ZAP-70 a CD38.

Cytogenetické změny ovlivňují prognózu pacienta velmi výrazně. Až u 80% pacientů můžeme najít jednu ze čtyř nejčastějších změn – delece 13q, trisomie 12, delece 17p, delece 11q. Pouze první jmenovaná znamená pro pacienta lepší prognózu. Je však zvláštní, že tato delece se vyskytuje i u jiných hematologických onemocnění (mnohočetný myelom, myeloproliferativní onemocnění, lymfomy) a tumorů (retinoblastom, karcinom plic), ale pro tato onemocnění není dobrým prognostickým markerem, právě naopak.

Prvním z výše jmenovaných molekulárních prognostických markerů je určení mutačního stavu variabilních segmentů těžkých řetězců imunoglobulinových genů. Jeho prognostická hodnota je vysoká a jako jediný ho lze samostatně považovat za postačující k určení prognózy pacientů. Běžné používání mutačního statusu v diagnostice a určování prognózy u nemocných s B-CLL naráží na časovou a technickou náročnost provedení

tohoto vyšetření. Proto se stále hledají zástupné prognostické markery, jejichž vyšetření je snadno proveditelné a mají dobrou prognostickou hodnotu.

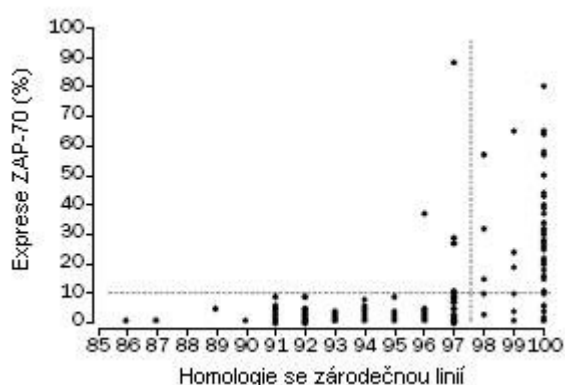
Jedním z potenciálně dobrých prognostických markerů je protein ZAP-70. Jeho detekce je velmi jednoduchá, časově nenáročná (průtoková cytometrie) a proto se zkoumala jeho prognostická hodnota. Autoři studií se však nemohou shodnout ani v tom, zda se hladina jeho exprese během nemoci mění či nemění. Crespo et al. (2003), Del Principe et al. (2006) a Ure et al. (2009) tvrdí, že hladina exprese ZAP-70 se během celého onemocnění nemění a lze ho tedy použít jako prognostický marker. Jejich studie dokonce ukazují na velmi vysokou prognostickou hodnotu tohoto markeru. Naopak Moralito et al. (2009) ve své studii zjistil, že ZAP-70 je u CLL buněk v raném stadiu onemocnění produkován méně a proto ho nelze pro určení prognózy využívat. Nejasná je i hranice pro určení positivity. Nicméně je prokazatelná spojitost mezi vyšší hladinou ZAP-70 a rychlejší progresí nemoci (Durig et al., 2003, Fernandez et al., 2008, Ure et al., 2009).

Druhým velmi diskutovaným potenciálním prognostickým markerem je exprese CD38. I hladina exprese CD38 na povrchu buňky je snadno detekovatelná pomocí průtokové cytometrie a mnoho studií se zabývalo vztahem hladiny exprese a prognózy pacientů. Zcela prokazatelně lze pacienty rozdělit do dvou skupin s rozdílnou prognózou. Skupina s vysokou hladinou exprese (skupina CD38⁺) má celkově horší prognózu oproti skupině s nízkou hladinou (skupina CD38⁻). Problémem však zůstává hranice pro určení CD38 positivity. Různí autoři navrhují různé hraniční hodnoty, nejvíce se však ve studiích využívala hranice 30% (pokud >30% všech buněk exprimovalo na svém povrchu CD38, patřil pacient do skupiny CD38⁺). Hus et al. (2006) dokonce vypracoval studii, kde porovnával výsledky s použitím jak hranice 30% pro určení positivity, tak 20% (druhá nejčastěji navrhovaná hranice) a nezjistil výrazné rozdíly. Vzhledem k možné změně exprese CD38 během onemocnění se nedoporučuje tento marker používat jako nezávislý prognostický marker, ale spíše může podat dodatečné informace (Hus et al., 2006, Oscier et al., 2002).

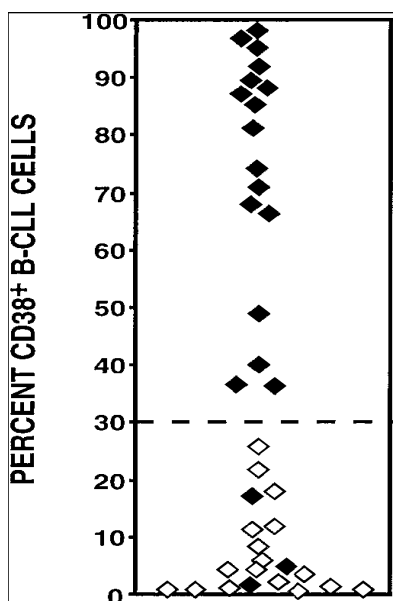
I použití kombinace exprese ZAP-70 a CD38 k určení prognózy nám poskytuje prognostické informace. Pacienty lze rozdělit do tří skupin. Skupina, která vykazuje expresi obou markerů má nejhorší prognózu, naopak skupina, která neexprimuje ani jeden marker má prognózu dobrou a třetí skupina pacientů, u které můžeme detekovat expresi buď ZAP-70 nebo CD38, patří do kategorie se středním rizikem (Moreno et Montserrat, 2008, Durig et al., 2003, Del Principe et al., 2006). Lze také pozorovat, že u CD38⁺

pacientů je procento leukemických buněk produkujících ZAP-70 vyšší než u CD38 negativních pacientů (Hus et al., 2006, Boonstra et al., 2006). Nicméně tento vztah není absolutní (Hallek, 2008).

Nejlepší výsledky v určení prognózy se ukazují při kombinaci několika molekulárních prognostických markerů. Bylo provedeno mnoho studií zkoumajících vzájemný vztah mutačního stavu IgVh genů, exprese ZAP-70 a exprese CD38. Bylo potvrzeno, že vysoká hladina ZAP-70 je exprimována u pacientů s nemutovanou formou CLL a naopak u mutované CLL je exprese ZAP-70 velmi nízká (obr. 3) (Hallek, 2008, Montserrat et Moreno, 2008, Del Principe et al., 2006). Podobný vztah byl objeven i mezi expresí CD38 a mutačním statutem. Vysokou expresí CD38 vykazovali pacienti, u nichž byla potvrzena přítomnost nemutovaných IgVh genů, naopak nízká exprese CD38 souhlasí s přítomností mutovaných IgVh genů (obr. 4) (Krober et al., 2002, Damle et al., 1999, Ibrahim et al., 2001, Ghia et al., 2003, Del Principe et al., 2006). Vzhledem k tomu, že jak vysoká exprese ZAP-70, tak vysoká exprese CD38 i přítomnost nemutovaných IgVh genů je spojena s nepříznivou prognózou, lze tyto vztahy předpokládat.



Obr. 3: Srovnání exprese ZAP-70 s mutačním stavem IgV_H (podle Orchard et al., 2004)



Obr. 4: Korelace Vh mutací a CD38+ (♦ nemutovaná B-CLL) (podle Damle et al. 1999)

Ze všech dostupných studií však vyplývá, že mutační status je stále nejlepším a jediným zcela nezávislým a neměnným prognostickým markerem a ostatní molekulární prognostické markery pouze prognózu určenou na základě mutačního statusu potvrdí.

Stále však kolem mutačního statusu zůstává mnoho otázek, které je potřeba vyřešit. Nejvíce otázek vyvolává hranice 98% pro rozdělení pacientů na dvě skupiny (případně 97% podle doporučení některých autorů (Krober et al., 2002)). Tato dvě procenta znamenají změnu ve 4–5 nukleotidech. Protože tak malá změna může být způsobena i nepřesností sekvenování, nepovažuje se za nemutovanou CLL 100% homologie. Jako změna v jednom nukleotidu je brána i inserce/delece. Podle našich výsledků má však většina nemutovaných pacientů 100% shodu s odpovídající zárodečnou linií. Na posouzení lékaře pak záleží, jak léčit pacienty s hraničními výsledky.

Naše statisticky zhodnocené výsledky se shodují se všemi ostatními dostupnými daty. Potvrzují, že se B-CLL vyskytuje častěji u mužů (88 pacientů s vyhodnoceným mutačním statutem, 61%) než u žen (56 pacientů s vyhodnoceným mutačním statutem, 39%), že nemoc postihuje starší pacienty. Náš nejmladší pacient s vyšetřeným mutačním statutem byl starý 40 let, ovšem homologie se zárodečnou linií nebyla příliš velká a dá se tedy předpokládat, že tento pacient nejspíš vůbec neměl B-CLL, ale nějaké jiné lymfoproliferativní onemocnění. Převážná většina našich pacientů se pohybovala ve věkovém rozmezí 62–85 let. Počet pacientů s mutovanou formou CLL mírně převažuje nad pacienty s nemutovanou (55% mutovaní, 45% nemutovaní). U případů nemutované CLL

nejčastěji zjišťujeme 100% homologii se zárodečnou linií. Co se týče zastoupení jednotlivých rodin, nejčastějším nálezem je rodina Vh3 a Vh1, rodiny Vh2, Vh5 a Vh6 se vyskytují jen ojediněle. Velmi častý je nález segmentu Vh 1–69 (22 pacientů s analyzovaným mutačním statutem, 15,3%) a to téměř vždy v nemutovaném stavu (pouze jeden pacient měl homologii <98%). U většiny pacientů nacházíme jen jeden klon, pouze u deseti pacientů byla potvrzena biklonalita. Sedmnáct pacientů jsme uzavřeli jako polyklonální a doporučili vyšetření po čase opakovat. Tři z těchto pacientů byli již opakovaně vyšetřeni a bylo u nich možno mutační status určit, lze u nich tedy usuzovat rozvoj onemocnění.

Nevysvětlenou stále zůstává biklonalita. Není zcela jasné, jak se stane, že v buňce selžou kontrolní mechanismy a buňka vytváří dva různé funkční imunoglobulinové řetězce a jaký je vliv této abnormality na vývoj nemoci. Dostupné studie (Cerny et al., 2004, Chang et al., 2006) se zmiňují pouze o případech, kdy jeden z klonů buněk produkuje nefunkční imunoglobulin. V našich výsledcích však někteří pacienti zcela proti všem očekáváním vytvářejí dva funkční klony buněk. Cerny ve své studii vyslovil názor, že biklonalita nemá na průběh nemoci žádný vliv. Jednalo se však o ojedinělou studii na toto téma a bylo by potřeba ještě dalšího zkoumání.

Z medicínského hlediska by bylo pro určení diagnózy a prognózy nejlepší, pokud by existoval jeden univerzální marker, který by nám o nemoci řekl vše. Určení diagnózy B-CLL není jednoznačné a následná prognóza je závislá na mnoha aspektech. Pro každého lékaře by bylo nejvýhodnější, kdyby existovala definovaná sada markerů určující prognózu a nejlepší způsob léčby. Mutační stav genů pro těžké řetězce imunoglobulinů se po celou dobu onemocnění nemění. To jsme v naší laboratoři potvrdili opakovaným kontrolním vyšetřením již jednou vyhodnocených pacientů. Zároveň má velmi silnou prognostickou hodnotu. Zdálo by se tedy, že mutační status by mohl být jedním z těchto dlouho hledaných „univerzálních“ markerů.

Vyšetřování mutačního statusu bylo do praxe zavedeno v roce 2004, v naší laboratoři se vyšetřuje od roku 2006. Náš soubor více než 200 pacientů přijatých k vyšetření mutačního statusu je jeden z největších, který byl ve studiích zhodnocen. Je však třeba zdůraznit, že tato metoda je stále velmi mladá a je brzy zhodnotit všechny její aspekty. Naším cílem do budoucna je další sledování pacientů s B-CLL a korelace mutačního statusu s průběhem onemocnění.

5. Souhrn

V současné době je u B-CLL jedním z nejdůležitějších prognostických markerů mutační status variabilního segmentu těžkých řetězců imunoglobulinových genů. Ve své práci jsem zhodnotila 172 pacientů s původní diagnózou CLL. V 17 případech jsem pomocí fragmentační analýzy CLL vyloučila a u ostatních byl stanoven mutační status. Stanovený mutační status rozdělil pacienty do dvou skupin, případy s příznivou a případy s nepříznivou prognózou. V tomto bodě jsme postupovali s ohledem na již publikované práce o analýze mutačního stavu. Vlastní hodnocení závislosti prognózy a následné léčby pacienta na mutačním stavu jsem nemohla provést, neboť nebylo k dispozici dostatečné množství klinických dat. V této práci však budu ještě pokračovat v rámci své práce v Laboratoři molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice, a.s..

6. Literatura

- Adam, Z., Vorlíček, J., (2001) Hematologie II Přehled maligních a hematologických nemocí. Grada Publishing, Praha
- Abousarma, N. K., El-Din, M. S., Azmy, E., (2009) T-cell CD38 expression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Oncol* 27: 82–89
- Bilous, N., Abramenko, I., Kryachok, I., Bazyka, D., Chumak, A., Bebeshko, V., (2005) Significance of VH genes mutation status for prognosis of CLL patients. *Exp Oncol* 27,4,325-329
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Belabbes, S., Gremy, F., (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198-206
- Boonstra, J., van Lom, K., Langerak, A., Graveland, W. J., Valk, P. J. M., Kraan, J., van't Veer, M. B., Gratama, J. W. (2006) CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. *Clinical Cytometry* 70B: 136–141
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Iorio, M. V., Visone, R., Sever, N. I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, Ch., Kipps, T. J., Negrini, M., Croce, C. M. (2005) A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353:1793-801
- Carlucci, F., Marinello, E., Tommassini, V., Pisano, B., Rosi, F., Tabucchi, A. (2009) A 57-gene expression signature in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63 663-671
- Cerny, J., Slavickova, A., Krepelova, A., Trneny, M., Karban, J., Klener, P. (2004) Biallelic IgH Rearrangements in patients with indolent lymphoproliferative disorders: molecular and practical implications. *J. Cell. Physiol.* 199:217-226
- Chang, H., Cerny, J. (2006) Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia with two distinct cell populations. *Am J Clin Pathol* 126: 23–28
- Chen, J., McMillan, N. (2008) Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Biology & Therapy* Vol. 7:2, 174–179
- Chiorazzi, N., Rai, K. R., Ferrarini, M. (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J*

Med 352:804-815

- Constantinides, I. P., Pathouli, Ch., Karvountzis, G., Papadopoulos, P., Varvoutsi-Constantinides, M., Eliakis, P., Hadziyannis, S., Komninos, Z., (1985) Serum B2Microglobulin in malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer* 55:2384-2389
- Cook, G. P., Tomlinson, I. M. (1995) The human immunoglobulin Vh receptoire. *Imunol Today* Vol. 16 No 5: 237-242
- Cordone, I., Masi, S., Mauro, F. R., Soddu, S., Morsilli, O., Valentini, T., Vegna, M. L., Guglielmi, C., Mancini, F., Giuliacci, S., Sacchi, A., Mandelli, F., Foa, R. (1998) p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood*, Vol 91, No 11, pp 4342–4349
- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., Montserrat, E., (2003) ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 348:1764-75
- Danilov, A. V., Danilova, O. V., Klein, A. K., Huber, B. T. (2006) Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Current Molecular Medicine* 6,665-675
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., Chiorazzi, N. (1999) Ig VH gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1840–1847
- Del Poeta, G., Maurillo, L., Venditti, A., Buccisano, F., Epiceno, A. M., Capelli, G., Tamburini, A., Suppo, G., Battaglia, A., Del Principe, M. I., Del Moro, B., Masi, M., Amadorf, S. (2001) Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98: 2633–2639
- Del Principe, M. I., Del Poeta, G., Buccisano, F., Buccisano, F., Maurillo, L., Venditti, A., Zucchetto, A., Marini, R., Niscola, P., Irno Consalvo, M. A., Mazzone, C., Ottaviani, L., Panetta, P., Bruni, A., Bomben, R., Suppo, G., Degan, M., Gattei, V., de Fabritiis, P., Cantonetti, M., Lo Coco, F., Del Principe, D., Amadori, S. (2006) Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 108:853-861
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Bener, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., Lichter, P. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic

- leukemia. *N Engl J Med* 343:1910-6
- Durig, J., Naschar, M., Schmucker, U., Renzing-Kohler, K., Holter, T., Huttmann, A., Duhrsen, U. (2002) CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 16, 30–35
- Durig, J., Nuckel, H., Cremer, M., Fuhrer, A., Halfmeyer, K., Fandrey, J., Moroy, T., Klein-Hitpass, L., Duhrsen, U. (2003) ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 17, 2426–2434
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Dighiero, G., Schroeder, H. W., Ferrarini, M., Chiorazzi, N. (1998) Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 102: 1515–1525
- Ferrarini, M., Dono, M., Burgio, V. L., et al. (2006) The cell of origin of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology* 180–184
- Fernandez, V., Jares, P., Salaverria, I., Gine, E., Bea, S., Aymerich, M., Colomer, D., Villamor, N., Bosch, F., Montserrat, E., Campo, E. (2008) Gene expression profile and genomic changes in disease progression of early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 93:(1)132–136
- Ghia, P., Guida, G., Stella, S., Gottardi, D., Geuna, M., Strola, G., Scielzo, C., Caligaris-Cappio, F. (2003) The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 101:1262-1269
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, Ch., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., Emmerich, B., (1999) Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoulding chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93: 1732–1737
- Hallek, M.:Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Oncology* 2008, 19 (supplement 4):iv51-iv53
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., Stevenson, F. K. (1999) Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1848–1854
- Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Thomas, P. W., Stevenson, F. K., Oscier, D. G. (2002) CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations

- are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 99: 1023–1029
- Hus, I., Podhorecka, M., Bojarska-Junak, A., Rolinski, J., Schmitt, M., Sieklucka, M., Wasik-Szczepanek, E., Dmoszynska, A., (2006) The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Annals of Oncology* 17: 683–690
- Huttmann, A., Klein-Hitpass, L., Thomale, J., Deenen, R., Carpinteiro, A., Nuckel, H., Ebeling, P., Fuhrer, A., Edelmann, J., Sellmann, L., Duhrsen, U., Durig, J. (2006) Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukaemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. *Leukemia* 20, 1774–1782
- Ibrahim, S., Keating, M., Do, K.-A., O'Brien, S., Huh, Y. O., Jilani, I., Lerner, S., Kantarjian, H. M., Albitar, M. (2001) CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98: 181–186
- Janeway, Ch. A., Travers, P., Walport, M., Schlomchik, M. J. (2001) *Imunobiology*. Garland Science, New York
- Kozák, T. (2008) Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie* 2(3):156–162
- Kröber, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Bruckle, E., Lichter, P., Dohner, H., Stilgenbauer, S. (2002) VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberration, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1410–1416
- Kuhrová, V., Francová, H., Klimešová, D., Mayer, J. (2004) Chronická lymfatická leukemie: mutační status těžkého řetězce imunoglobulinového genu je významné prognostické kritérium. *Trans. Hemat. Dnes* 10, No. 4, 143–148
- Kuhrová, V., Francová, H., Klimešová, et al. (2006) Molekulárně-genetická charakterizace agresivity chronické lymfocytární leukémie u českých pacientů: nukleotidová variabilita genů kódující syntézu těžkého řetězce imunoglobulinů. *Čas. Lék. Čes.* 145, 855–858
- Magnac, C., Porcher, R., Davi, F., Nataf, J., Payelle-Brogard, B., Tang, R. P., Oppezzo, P., Levy, V., Dighiero, G., Ajchenbaum-Cymbalista, F. (2003) Predictive value of serum thymidine kinase level for IgV mutational status in B-CLL. *Leukemia* 17, 133–137
- Mayer, J (2002) *Leukemie*. Grada Publishing, Praha
- Mayer, J., Schwarz, J., Doubek, M., Brychtová, Y., Brejcha, M., Pospíšilová, Š., Trbušek, M., Kuhrová, V. (2007) Co nám v každodenní praxi skutečně říkají tzv. Moderní prognostické faktory u chronické lymfatické Leukemie? *Trans. Hemat. Dnes* 13, No. 3, p. 106–116

- Molica, S., Alberti, A. (1987) Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 60: 2712–2716
- Molica, S., Levato, D., Dell'olio, M., Matera, R., Minervini, M., Dattilo, A., Carotenuto, M., Musto, P. (1996) Cellular expression and serum circulating levels of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 81: 428–433
- Montserrat, E., Sanchez-Bisono, U., Vinolas, N., Rozman, C. (1986) Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *British Journal of Haematology* 62, 567–575
- Montserrat, E., Moreno, C. (2008) Chronic lymphocytic leukaemia: short overview. *Annals of Oncology* 19 (supplement 7):vii320-vii325
- Morabito, F., Cutrona, G., Gentile, M., et al.(2009) Definition of progression risk based on combinations of cellular and molecular markers in patients with Binet stage A chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 146, 44–53
- Moreno, C., Montserrat, E. (2008) New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Reviews* 22, 211–219
- Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P. W., Hamblin, T. J., Staudt, L. M., Oscier, D. G. 2004. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 363: 105-111.
- Oscier, D. G., Thompsett, A., Zhu, D., Stevenson, F. (1997) Differential rates of somatic hypermutation in Vh genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities: *Blood*, Vol 89, No 11, pp 4153–4160
- Oscier, D. G., Gardiner, A. C., Mould, S. J., Glide, S., Davis, Z. A., Ibbotson, R.E., Corcoran, M.M., Chapman, R.M., Thomas, P.W., Copplestone, J.A., Orchard, J.A., Hamblin, T.J. (2002) Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 100: 1177–1184
- Panovska-Stavridis, I., Ivanovski, M., Siljanovski, N., Cevreska, L., Efremov, D. (2007) Chronic lymphocytic leukemia patients with a V1-69 gene rearrangement do not have inferior survival with respect to patients that express other unmutated Vh genes. *Leukemia Research* 31 245-248
- Papajík, T., Jarošová, M., Plachý, R., Indrák, K. (2006) Chronická B-lymfocytární leukemie Část I: Pohled na původ, biologii a genetické změny leukemických buněk. *Trans. Hemat. Dnes*, 12, No. 2, p. 53–61

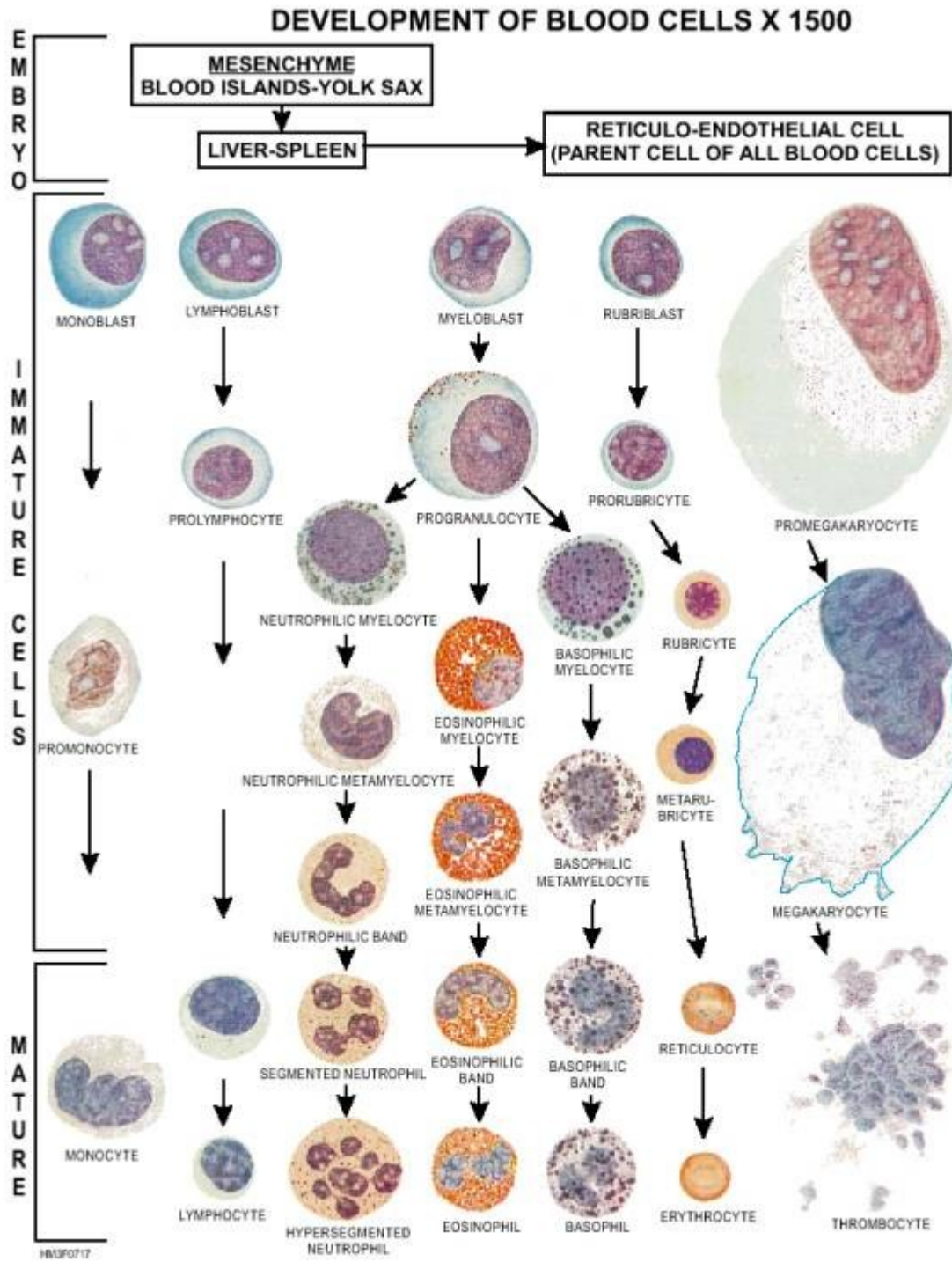
- Papajík, T., Jarošová, M., Pikalová, Z., Indrák, K. (2006) B-chronická lymfatická leukemie
Část II: Diagnostická kritéria a význam stanovení individuální prognózy nemocného.
Trans. Hemat. Dnes, 12, No. 3, p. 132–139
- Papajík, T., Urbanová, R., Procházka, V., Indrák, K. (2006) Chronická B-lymfocytární
leukemie Část III: Současné konvenční možnosti primární léčby. Trans. Hemat. Dnes,
12, No. 4, p. 249–256
- Papajík, T., Urbanová, R., Kubová, Z., Indrák, K. (2007) Chronická B-lymfocytární
leukemie Část IV: Možnosti léčby s použitím monoklonálních protilátek alemtuzumabu
a rituximabu. Trans. Hemat. Dnes, 13, No. 2, p. 48–55
- Papajík, T., Raida, L., Faber, E., Indrák, K. (2007) Chronická B-lymfocytární leukemie
Část V: Transplantace krvetvorných buněk. Trans. Hemat. Dnes, 13, No. 3, p. 100–105
- Rai, K. R., Sowitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A.D., Levy, R. N., Pasternack, B. S.
(1975) Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 46: 219–234
- Stevenson, F., Caligaris-Cappio, F. (2004) Chronic lymphocytic leukemia: revelations from
the B-cell receptor. Blood 103:4389-4395
- Thorsélius, M., Kröber, A., Murray, F., et al. (2006) Strikingly homologous
immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in Vh3-21-using chronic
lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status.
Blood 107: 2889–2894
- Tinhofer, I., Rubenzer, G., Holler, C., Hofstaetter, E., Stoecher, M., Egle, A., Steurer, M.,
Greil, R. (2006) Expression levels of CD38 in T cells predict course of disease in male
patients with B-chronic lymphocytic leukemia. Blood 108: 2950–2956
- Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Thorn, I., Soderberg, O., Hultdin, M., Botling, J.,
Enblad, G., Sallstrom, J., Sundstrom, Ch., Roos, G., Rosenquist, R. (2002) Somatic
mutated Ig Vh3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia.
Blood 99: 2262–2264
- Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Eriksson, I., Soderberg, O., Karlsson, K., Juliusson,
G., Vilpo, J., Enblad, G., Sundstrom, Ch., Roos, G., Rosenquist, R. (2003) Chronic
lymphocytic leukemias utilizing the Vh3-21 gene display highly restricted V2-14 gene
use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope.
Blood 101: 4952–4957
- Ure, U., Ar, M. C., Baslar, Z., Soysal, T., Ongoren, S., Gulseven, M., Aydin, Y., Ulku, B.,
Tuzuner, N., Farhanoglu, B. (2009) The effect of ZAP-70 expression on disease

progression in early-stage (Binet A) B-CLL patients. *Trakya Univ Tip Fak Derg* 26(4): 317–321

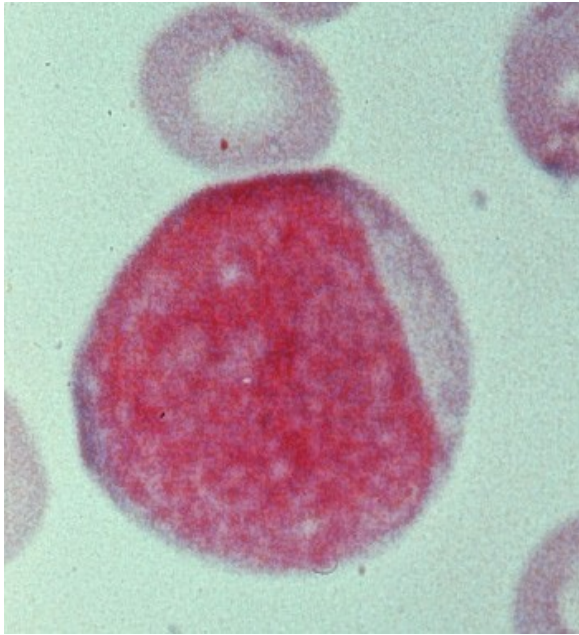
Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T. S., Wright, G., Davis, R. E., Henrickson, S. E., Zhao, H., Ibbotson, R. E., Orchard, J. A., Davis, Z., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., Arthur, D. C., Marti, G. E., Wilson, W. H., Hamblin, T. J., Oscier, D. G., Staudt, L. M. (2003) ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101: 4944–4951

7. Přílohy

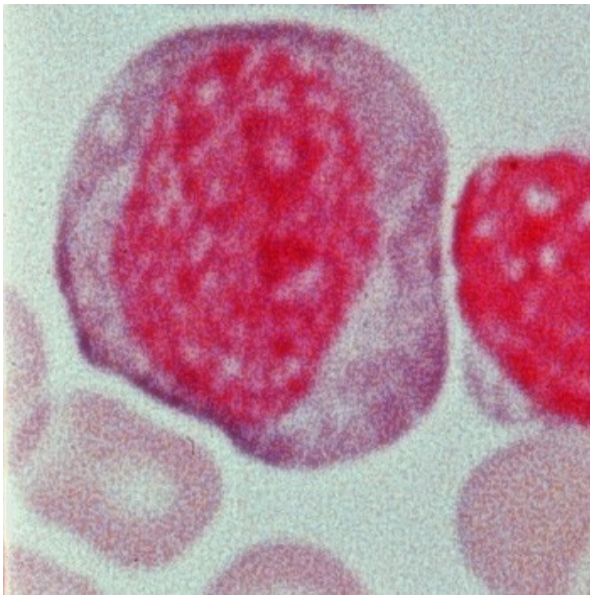
Příloha 1: <http://www.tpub.com>



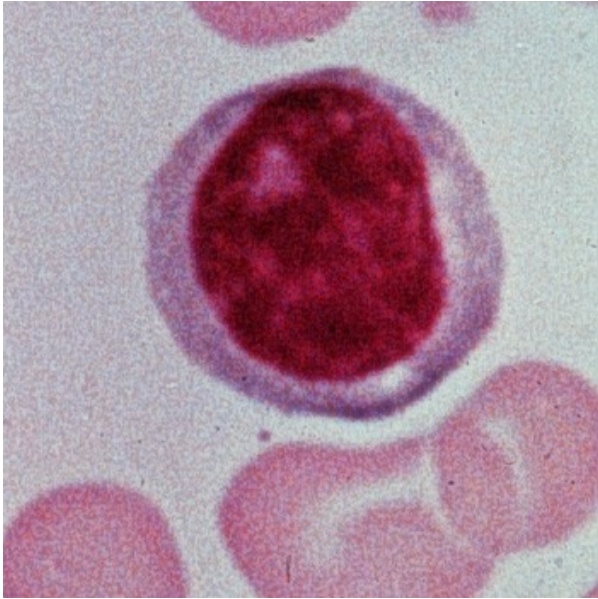
Příloha 2: <http://8e.devbio.com>



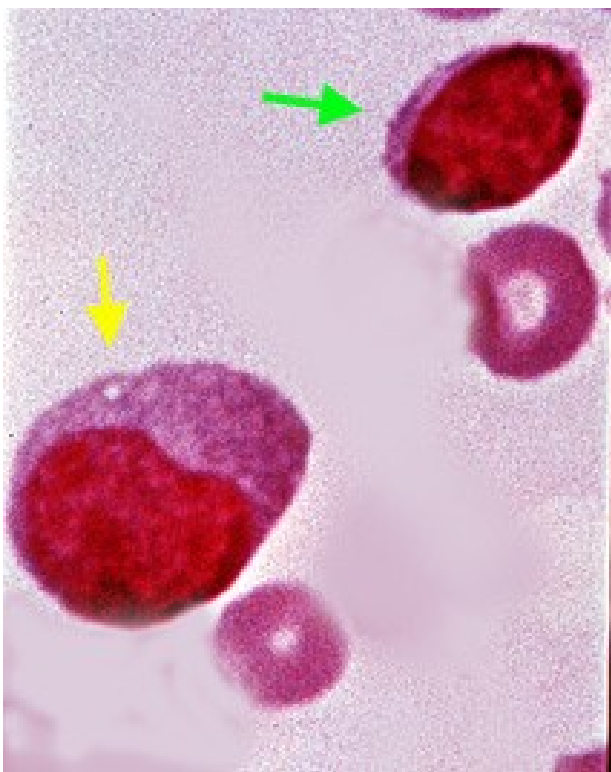
záradečná buňka



lymfoblast



prolymfocyt



velký (žlutý) a malý (zelený) lymfoocyt

Příloha 3: Tabulka pacientů

pacient	ročník	pohlaví	rodina IgVh	mut. Status	druhý klon
014/07	1942	M	IgVh 1-69	100,00%	
1029/08	1940	F	IgVh 1-24	99,30%	
1037/06	1952	M	IgVh 1-69	99,70%	
1042/06	1959	F	IgVh 1-69	99,70%	
1159/06	1952	F	IgVh 1-46	93,90%	
1195/07	1931	F	IgVh 1-3	88,88%/87%	
1238/09	1944	M	IgVh 1-2	99,65%	
1299/07	1946	F	IgVh 1-2	94,09%/94,2%	
132/07	1934	M	IgVh 1-69	93,05%/92,9%	
1460/09	1938	M	IgVh 1-2	100,00%	
1482/09	1946	M	IgVh 1-18	99,60%	
1523/09	1931	M	IgVh 1-69	100,00%	
1702/07	1925	M	IgVh 1-69	100,00%	
1789/06	1933	M	IgVh 1-46	100,00%	
1818/07	1926	F	IgVh 1-2	92,71%/92,9%	
1839/06	1950	M	IgVh 1-69	100,00%	
1907/07		M	IgVh 1-3	99,65%	
1973/07	1953	F	IgVh 1-69	100,00%	
2021/07	1930	F	IgVh 1-69	100,00%	
210/08	1944	M	IgVh 1-3	100,00%	
2187/07	1946	M	IgVh 1-69	100,00%	
2144/08	1952	M	IgVh 1-69	100,00%	
2252/08 = 463/08	1937	M	IgVh 1-69	100,00%	
2340/09	1933	F	IgVh 1-69	100,00%	
2449/08	1927	M	IgVh 1-69	100,00%	
2493/07	1935	F	IgVh 1-69	100,00%	
330/08	1938	M	IgVh 1-2	99,70%	
334/08	1944	F	IgVh 1-46	100,00%	
3444/09	1934	M	IgVh 1-69	100,00%	
429/08	1945	F	IgVh 1-69	100,00%	
2783/09	1932	F	IgVh 1-8	84,38%/84,8%	
496/06	1940	F	IgVh 1-69	100,00%	
5079/09	1931	F	IgVh 1-69	100,00%	
003/09	1948	M	IgVh 4-61	93,13%	
1008/07	1942	F	IgVh 4-39	98,62%	
5396/09	1935	M	IgVh 1-46	100,00%	
580/06	1926	F	IgVh 1-8	93,00%	
599/08	1932	M	IgVh 1-69	100,00%	
608/07	1931	M	IgVh 1-2	96,87%	
693/07	1941	M	IgVh 1-69	100%/99,3%	
695/06	1941	F	IgVh 1-2	93,50%	
734/07	1942	M	IgVh 1-18	100,00%	
853/07	1936	F	IgVh 1-3	87,84%	
880/09 = 166/09	1930	M	IgVh 1-46	100%/100%	
887/07	1940	M	IgVh 1-69	100,00%	
908/07	1941	F	IgVh 1-2	100,00%	
970/08	1936	M	IgVh 1-69	99,65%/99,7%	

2327/08	1930	M	IgVh 2-26	100,00%	
2365/06	1943	M	IgVh 2-5	95,18%	
3775/09	1959	M	IgVh 2-5	96,6%/96,7%	
1009/07	1956	M	IgVh 3-15	95,57%/95,7%	
1022/08 = 1170/07	1940	F	IgVh 3-21	97,5%/97,0%	
1057/08	1952	M	IgVh 3-30	100,00%	
1079/08	1960	F	IgVh 3-30	99,0%/98,9%	
1125/08 = 634/08	1946	M	IgVh 3-30	93,8%/93,9%	
1129/08	1944	M	IgVh 3-21	97,57%	
1142/08	1932	M	IgVh 3-7	92,01%/92,2%	
1170/07 = 1022/08	1940	F	IgVh 3-21	95,43%/97%	
1172/09 = 684/08 = 2534/09	1955	M	IgVh 3-30	91,70%	
122/09	1940	M	IgVh 3-21	97,9%/98%	
124/07	1932	F	IgVh 3-15	98,29%/98%	
128/09	1952	F	IgVh 3-7	94,70%	
1294/06	1943	F	IgVh 3-23	91,20%	
1323/06 = 1472/07	1937	M	IgVh 3-53	99,00%	
1363/09	1944	M	IgVh 3-9	100,00%	
1396/07	1950	M	IgVh 3-33	100,00%	
1404/06	1929	M	IgVh 3-30	99,00%	
1412/08	1935	F	IgVh 3-23	98,26%	
1419/07	1938	F	IgVh 3-66	97,89%	
1472/07 = 1323/06	1937	M	IgVh 3-53	98,95%	
1473/07	1955	M	IgVh 3-30	89,24%	
1482/07	1930	M	IgVh 3-33	95,49%/95,6%	
1514/07 = 648/07	1939	M	IgVh 3-11	99,31%	
1532/09	1946	F	IgVh 3-23	89,24%/89,5%	
1580/08	1934	M	IgVh 3-15	98,30%	
1596/09	1939	F	IgVh 3-53	92,6%/90,9%	
1650/08 = 5475/09	1947	M	IgVh 3-49	100,00%	
168/10	1956	M	IgVh 3-30	100,00%	
1685/08	1946	F	IgVh 3-7	91,2%/92,0%	
1727/08	1934	F	IgVh 3-7	95,2%/95,14%	
1875/07	1925	F	IgVh 3-30	100,00%	
1926/07	1933	M	IgVh 3-9	100,00%	
1940/09	1945	M	IgVh 3-21	100,00%	
1952/09	1928	M	IgVh 3-30	100,00%	
1967/09	1937	F	IgVh 3-72	96,00%	
2036/07	1948	M	IgVh 3-74	93,40%	
2065/07	1950	F	IgVh 3-23	89,68%/89,8%	
2100/08	1942	F	IgVh 3-30	94,99%/94,79%	
2131/06	1953	M	IgVh 3-11	100,00%	
2143/08	1927	M	IgVh 3-48	95,5%/95,6%	
2178/06	1946	F	IgVh 3-74	94,09%	
2184/07	1937	F	IgVh 3-74	90,97%/90,8%	
2290/06	1938	F	IgVh 3-33	96,52%	
2302/08	1927	M	IgVh 3-23	90,28%/90,4%	
2404/06	1952	M	IgVh 3-9	100,00%	
2509/07	1927	M	IgVh 3-11	99,31%	
2534/09 = 684/08 =	1955	M	IgVh 3-30	91,80%	

2534/09					
2631/09	1927	F	IgVh 3-72	96,60%	
2909/09	1934	M	IgVh 3-48	100,00%	
357/08	1937	F	IgVh 3-30	91,30%	
430/08	1951	M	IgVh 3-66	98,25%	
4425/09	1937	M	IgVh 3-48	98,26%	
4695/09	1933	M	IgVh 3-30	100,00%	
4751/09	1949	M	IgVh 3-11	99,31%/99,3%	
5197/09	1923	F	IgVh 3-23	91,20%	
542/07	1928	M	IgVh 3-9	100,00%	
544/09	1946	F	IgVh 3-21	97,57%/97,3%	
5475/09 = 1650/08	1947	M	IgVh 3-49	100,00%	
5493/09	1940	M	IgVh 3-30	100%/100%	
59/07	1936	F	IgVh 3-74	94,44%/94,5%	
634/08 = 1125/08	1946	M	IgVh 3-30		
645/08	1925	F	IgVh 3-66	98,25%	
648/07 = 1514/07	1939	M	IgVh 3-11	99,30%	
697/07	1927	F	IgVh 3-30	94,79%/94,9%	
718/09	1941	F	IgVh 3-30	100%/100%	
755/06	1942	M	IgVh 3-9	97,60%	
871/06	1952	M	IgVh 3-72	94,60%	
873/06	1935	M	IgVh 3-74	95,50%	
881/06	1951	M	IgVh 3-21	98,60%	
903/09	1946	F	IgVh 3-15	94,56%/94,9%	
907/07	1936	F	IgVh 3-30	100,00%	
1070/08	1942	M	IgVh 4-31	93,5%/93,8%	
1106/09	1940	F	IgVh 4-39	100,00%	
1158/08	1936	M	IgVh 4-61	97,25%	
1176/08	1941	F	IgVh 4-34	92,9%/93,2%	
1310/08	1939	F	IgVh 4-34	94,2%/94,0%	
1522/09	1931	M	IgVh 4-61	94,85%/94,3%	
1584/06	1921	F	IgVh 4-39	100,00%	
1624/08	1951	M	IgVh 4-34	100,00%	
178/07	1938	M	IgVh 4-59	87,00%	
2031/06	1934	F	IgVh 4-61	97,93%	
2058/08	1951	M	IgVh 4-b	99,70%	
2096/06	1947	M	IgVh 4-61	93,47%	
2097/08	1932	M	IgVh 4-59	89,82%/89,9%	
2276/06	1954	M	IgVh 4-39	98,62%	
2279/08	1935	M	IgVh 4-59	98,58%/95,6%	
2393/07	1962	M	IgVh 4-34	95,79%	
2426/07	1947	F	IgVh 4-59	96,49%	
3394/09	1939	M	IgVh 4-59	100,00%	
345/08	1933	F	IgVh 4	100,00%	
3959/09	1970	M	IgVh 4-34	93,7%/93,5%	
4147/09	1948	M	IgVh 4-59	92,28%/91,93%	
5332/09	1941	M	IgVh 4-39	100,00%	
5377/09	1947	M	IgVh 4-34	91,60%	
481/09	1943	F	IgVh 4-39	90,88%/90,8%	
73/10	1945	F	IgVh 4-39	99,6%/99,7%	
855/06	1938	M	IgVh 4-34	100,00%	

930/08	1944	M	IgVh 4-39	95,19%/95,0%	
1838/08 = 510/08	1951	M	IgVh 5	99,30%	
1549/06	1926	M	IgVh 5-51	99,70%	
142/10	1948	F	IgVh 5-51	89,9%/90%	
465/09	1943	M	IgVh 5-a	100%/100%	
4817/09	1917	M	IgVh 5-a	94,79%	
2803/09	1932	M	IgVh 6-1	99,66%	
166/09 = 880/09	1930	M	IgVh 1-46	100,00%	IgVh 3-48, 100%, produk.
194/08	1930	M	IgVh 1-69	100,00%	IgVh 3-33, 100%, neprod.
2640/09	1943	M	IgVh 1-69	100,00%	IgVh 4-b, 100%
2662/09	1957	M	IgVh 1-69	100,00%	IgVh 4-39, 100%
435/07	1929	M	IgVh 1-2	100,00%	IgVh 3-30, 100%, produk
4919/09	1948	M	IgVh 1-3	100,00%	IgVh 3-7, 99,7%
681/06	1940	F	IgVh 1-69	100,00%	IgVh3-30, 100%
1011/07	1928	M	IgVh 3-7	99,70%	IgVh 4-34, 99,3%/100%, neprod.
147/08	1937	F	IgVh 3-7	95,49%	IgVh 4-55, 94,44%, neprod.
1908/09	1941	F	IgVh 3-13	100,00%	IgVh 4-30, 100%, neprod.
960/06	1940	M	IgVh 3-21	98,30%	IgVh 4-39, 98,7%
3048/09	1926	F	IgVh 3-9	92,70%	IgVh 1-24, 97,92%, prod.
607/08 = 2337/07	1932	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
94/08	1948	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
85/08 = 2754/09	1941	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
2507/07	1943	F	fragment. Anal. - polyklonalita		
2518/08	1953	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
2599/09	1945	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
2683/09	1944	F	fragment. Anal. - polyklonalita		
2720/09	1932	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
2754/09 = 85/08	1941	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
288/08	1938	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
3287/09	1923	F	fragment. Anal. - polyklonalita		
3527/09	1947	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
3684/09	1931	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
463/08 = 2252/08	1937	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
510/08 = 1838/08	1951	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
684/08 = 1172/09 = 2534/09	1955	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
2337/07 = 607/08	1932	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
2115/07	1943	M	fragment. Anal. - polyklonalita		
1451/09	1956	F	fragment. Anal. - polyklonalita		
1934/09	1934	F	fragment. Anal. - polyklonalita		