

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2016

Miriam Demková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Miriam Demková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**VÝZNAM CYTOGENETICKÝCH VYŠETŘENÍ
NÁDOROVÝCH BUNĚK U PACIENTŮ S VYBRANÝMI
HEMATOLOGICKÝMI MALIGNITAMI**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Pavel Dvořák

PLZEŇ 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 29. 3. 2016

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala RNDr. Pavlu Dvořákovi za vstřícný přístup, odborné vedení, konzultace a cenné rady při tvorbě této práce.

Anotace

Příjmení a jméno: Demková Miriam

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Význam cytogenetických vyšetření nádorových buněk u pacientů s vybranými hematologickými malignitami

Vedoucí práce: RNDr. Pavel Dvořák

Počet stran – číslované: 61

Počet stran – nečíslované: 26

Počet příloh: 6

Počet titulů použité literatury: 31

Klíčová slova: cytogenetika – hematologie - hematoonkologie – chromosom - karyotyp – leukémie – malignity - vyšetřovací metody

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá tématem významu cytogenetických vyšetření nádorových buněk u pacientů s hematologickými malignitami. Práce je zaměřena na leukémie, které patří mezi velmi časté hematologické malignity jak u dospělých, tak u dětských pacientů. V teoretické části jsou podrobně popsány jednotlivé cytogenetické metody používané ke zhodnocení nádorových buněk pacientů. Dále je tato část zaměřená na popis a charakteristiku hlavních typů leukémií. Praktická část práce se soustředí konkrétně na chronickou lymfocytární leukémii, přičemž výsledkem této části je sestavená statistika souboru dat z cytogenetických vyšetření pacientů léčených ve Fakultní nemocnici v Plzni. Závěrem je zhodnocen význam cytogenetických vyšetření pro prognózu pacientů s chronickou lymfocytární leukémií s ohledem na analyzovaná data.

Annotation

Surname and name: Demková Miriam

Department: Department of theoretical fields

Title of thesis: Importance of cancer cells cytogenetic analyses in patients with selected haematological malignancies

Consultant: RNDr. Pavel Dvořák

Number of pages – numbered: 61

Number of pages – unnumbered: 26

Number of appendices: 6

Number of literature items used: 31

Keywords: cytogenetics - haematology - haematooncology - chromosome - karyotype - leukemia - malignancies - analysing methods

Summary:

This bachelor thesis deals with the importance of cytogenetic analyses of tumor cells in patients with selected haematological malignancies. This thesis is focused on leukemias, which are very frequent haematological malignancies in adults as well as children. The theoretical part describes in detail cytogenetic methods, which are used to analyse the tumor cells of patients. This part is also focused on description and characteristics of the main types of leukemias. The practical part is focused especially on chronic lymphocytic leukemia. Result of this section is statistical data analysis of cytogenetic examinations in patients who were treated in University Hospital in Pilsen. These analysed data are finally used to evaluate an importance of cytogenetic tests for the prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia.

OBSAH

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHROMOSOM A JEHO VLASTNOSTI	12
1.1 Struktura chromosomu	12
1.2 Význam v buňce	12
1.3 Chromosomové změny	12
2 CYTOGENETICKÁ VYŠETŘENÍ	14
2.1 Účel cytogenetiky	14
2.2 Příprava preparátu	14
3 LABORATORNÍ METODY V CYTOGENETICE	16
3.1 Klasická klinická cytogenetika	16
3.1.1 Klasické barvení (solid staining)	16
3.1.2 G -pruhování	16
3.1.3 Q -pruhování	17
3.1.4 R -pruhování (reverzní)	17
3.1.5 C -pruhování	17
3.1.6 NOR staining (Nucleolar organizer regions staining)	18
3.1.7 Metoda HRT (High resolution technique)	18
3.2 Molekulární cytogenetika	18
3.2.1 Obecný princip metod založených na in situ hybridizaci	19
3.2.2 Sondy	19
3.2.3 FISH (Fluorescence in situ hybridization)	20
3.2.4 M -FISH (Multicolor fluorescence in situ hybridization)	21
3.2.5 SKY (Spectral karyotyping)	21
3.2.6 M -BAND (Multicolor banding)	21
3.2.7 Chromosomová CGH (Comparative genome hybridization)	21
3.2.8 Array CGH	22
4 LEUKÉMIE	23
4.1 Krvetvorba	23
4.2 Příčiny vzniku leukémií	24
4.3 Diagnostický postup a princip léčby leukémií	25
4.4 Akutní myeloidní leukémie (AML)	25
4.4.1 Obecná charakteristika onemocnění	25
4.4.2 Cytogenetické změny	26
4.4.3 Léčba	26
4.5 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)	27
4.5.1 Obecná charakteristika onemocnění	27

4.5.2	Cytogenetické změny	27
4.5.3	Léčba.....	27
4.6	Chronická myeloidní leukémie (CML)	28
4.6.1	Obecná charakteristika onemocnění	28
4.6.2	Cytogenetické změny.....	28
4.6.3	Léčba.....	28
4.7	Chronická lymfocytární leukémie (CLL).....	29
4.7.1	Obecná charakteristika onemocnění	29
4.7.2	Diagnostika	30
4.7.3	Cytogenetické změny.....	30
4.7.4	Klasifikace CLL.....	32
4.7.5	Léčba.....	33
	PRAKTICKÁ ČÁST.....	35
5	CÍLE A ÚKOLY VÝZKUMU	35
5.1	Cíle výzkumu	35
5.2	Výzkumné otázky.....	35
6	METODIKA VÝZKUMU	36
7	CYTOGENETICKÁ NOMENKLATURA	37
7.1	Pruhování chromosomů.....	37
7.2	Normální a patologický karyotyp.....	38
7.2.1	Zápis numerických aberací	38
7.2.2	Zápis strukturních aberací.....	38
7.2.3	Zápis nádorových klonů buněk	39
7.3	Vyhodnocení vybraných karyotypů	40
8	ZKOUMANÝ VZOREK PACIENTŮ.....	43
9	PREZENTACE A INTERPRETACE ZÍSKANÝCH ÚDAJŮ.....	62
9.1	Vyhodnocení souboru pacientů	62
9.2	Vyhodnocení výsledků metody FISH	62
9.2.1	Četnost jednotlivých aberací.....	62
9.2.2	Analýza významu nalezených mutací.....	65
10	DISKUZE.....	68
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM ZDROJŮ	
	SEZNAM ZKRATEK	
	SEZNAM TABULEK	
	SEZNAM GRAFŮ	
	SEZNAM OBRÁZKŮ	
	SEZNAM PŘÍLOH	
	PŘÍLOHY	

ÚVOD

Cytogenetika je významný podbor genetiky, zabývající se studiem chromosomů a jejich změn. Klasické cytogenetické a molekulárně-cytogenetické metody se postupně staly součástí vyšetření i u pacientů s hematologickými malignitami, přičemž tato práce je zaměřena již konkrétně na leukémie.

Leukémie jsou hematologické malignity, které byly poprvé popsány v polovině 19. století. V případě leukémií jsou nádorově zasaženy bílé krvinky. Společným znakem nádorových buněk je nekontrolovatelné množení, což je následek některých genetických mutací. Snahou genetických a cytogenetických vyšetření je tyto mutace odhalit a upřesnit diagnózu či prognózu pacienta.

Teoretická část této práce je zaměřena na shrnutí základních poznatků o cytogenetických metodách používaných k vyšetření chromosomových aberací a také na stručné charakterizování základních podskupin leukémií. Informace o těchto tématech jsou čerpány z odborných publikací, studií a výzkumů.

Stěžejním tématem pro výzkum v praktické části byla zvolena chronická lymfocytární leukémie (CLL), jako jedna z častých forem leukémií, objevující se převážně u starších pacientů. Chronická lymfocytární leukémie je specifická tím, že má sama o sobě velmi variabilní průběh. Rozmanitosti CLL jsou dané mimo jiné i přítomností některých z mnoha chromosomových změn, na které bude v této práci poukazováno.

Hlavním cílem je podrobněji rozebrat problematiku chronické lymfocytární leukémie a sestavit dle hledaných parametrů zkoumaný soubor pacientů s tímto onemocněním. Dalším cílem je obeznámit se s cytogenetickou nomenklaturou a jejími základními pravidly, dle nichž bude proveden rozbor vybraných karyotypů pacientů. Účelem je z poskytnutých dat o pacientech ze souboru vytvořit statistiku a analyzovat u tohoto souboru četnosti výskytu chromosomových změn. Snahou této práce je také dle získaných informací zjistit, jak jednotlivé chromosomové aberace mohou ovlivňovat prognózu pacienta. Závěrem výzkumu je celkové vyhodnocení dat a objasnění významu cytogenetických vyšetření.

TEORETICKÁ ČÁST

1 CHROMOSOM A JEHO VLASTNOSTI

1.1 Struktura chromosomu

Základními buněčnými strukturami přítomnými v jádře buněk jsou chromosomy, které jsou součástí chromatinu. Každý chromosom je tvořen nukleohistonovým vláknem, složeným z řetězce deoxyribonukleové kyseliny (DNA), histonů a dalších nehistonových proteinů. Všechny tyto prvky jsou jako soubor součástí nukleosomu. (1)

Chromosom je tvořen dvěma chromatidami, které se skládají z krátkého (p-) a dlouhého (q-) raménka. Raménka jsou rozděleny centromerou, zúžením uplatňujícím se v buněčném dělení jako uchycení pro dělicí vřetenko. Na koncích ramének se nacházejí repetitivní sekvence zvané telomery. Tyto sekvence se při opakovaném dělení buňky zkracují a tento proces úzce souvisí s délkou života buňky. Porucha funkce telomer nebo příslušných enzymů je často pozorována u nádorových buněk, jejichž hlavním rysem je nekontrolovatelné dělení. (1, 2)

1.2 Význam v buňce

Základní funkcí všech 46 chromosomů v jádře buňky je uchovat a přenášet genetické informace v průběhu života jedince a také přenášet informace mezi jednotlivými generacemi. Výsledný obraz všech chromosomů včetně zobrazených odchylek se nazývá karyotyp. (2)

Pohlaví jedince je určeno variantou kombinací monozomů (pohlavních chromosomů X a Y) vznikající při meióze. Dále se rozlišují párové nepohlavní chromosomy zvané autozomy. Dělení somatických buněk jedince probíhá formou mitózy. (1)

1.3 Chromosomové změny

Aberace probíhají na úrovni změn struktury nebo počtu chromosomů a mohou být vrozeného i získaného původu. Získané změny se v ojedinělých případech objevují spontánně, avšak většinou se na jejich vzniku podílí mutageny fyzikálního, biologického či chemického charakteru. Postižené mohou být buď zárodečné buňky, kdy se mutace často předává z generace na generaci, nebo somatické buňky, kdy je postižena samostatná tkáňová buněčná linie s nemožností genetického přenosu na potomky. (3)

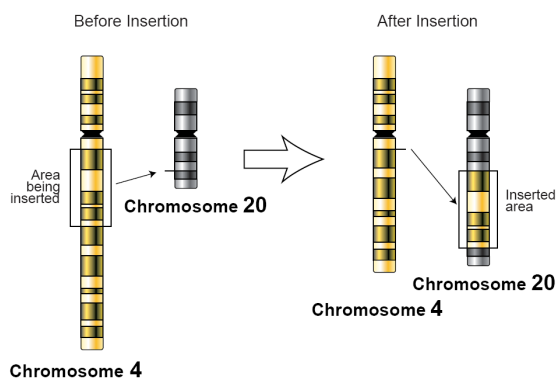
Numerické mutace se mohou vyznačovat zmnožením celé chromosomové sady, nebo ztrátou či zmnožením jednotlivých chromosomů. Normální sada chromosomů je diploidní ($2n$) se 46 chromosomy. Zmnožení sady chromosomů, jako jsou triploidie ($3n$) či tetraploidie ($4n$) jsou neslučitelné se životem. Aneuploidie jsou odchylky v počtu jednotlivých chromosomů, které mohou v sadě chybět, nebo naopak přebývat. Mohou se vyskytovat například ve formě monosomie (chybí chromosom do páru) či trisomie (tři chromosomy oproti původnímu páru). (3)

Strukturní mutace jsou chyby zapříčiněné primárně zlomy chromosomů. Důsledkem těchto zlomů je často změna pořadí genů nebo delece či duplikace některých částí. Strukturní mutace lze rozdělit na balancované a nebalancované. U balancovaných mutací je množství genetického materiálu zachováno, zatímco u nebalancovaných mutací chromosomový materiál chybí či přebývá. (3)

Do skupiny balancovaných mutací patří inverze, při které dochází mezi dvěma zlomy k přetočení části chromosomu. Dále sem lze zařadit Robertsonské a reciproké translokace, charakteristické výměnou segmentu mezi chromosomy. Do této skupiny patří také inserce, kdy je materiál z jednoho chromosomu vložen do jiného chromosomu. Příklad inserce je k vidění na obrázku č. 1. (3)

Nejčastější nebalancované mutace jsou delece. V tomto případě chybí určitá část segmentu na chromosomu. U duplikací je naopak chromosomový segment zdvojený. Chybným dělením vznikají izochromosomy, které mají jedno raménko zdvojené, zatímco druhé zcela chybí. Mezi zřídka se objevující nebalancované mutace patří dicentrické chromosomy, vznikající spojením dvou chromosomů. (3)

Obrázek 1: Inzerce mezi chromosomy 4 a 20



Zdroj: (4)

2 CYTOGENETICKÁ VYŠETŘENÍ

2.1 Účel cytogenetiky

Klinická cytogenetika je obor zabývající se vlastnostmi a změnami lidského karyotypu. Vyšetření chromosomových aberací je důležité pro diagnostiku v mnoha odvětvích genetického poradenství a to v prenatálním i postnatálním vyšetření. Cytogenetické vyšetření často předchází molekulárně genetickému vyšetření DNA a nastíní tak možný chybný úsek v řetězci. (5)

Prenatální cytogenetická analýza karyotypu plodu je doporučována starším matkám pro včasné zjištění případných vrozených mutací. Věk matek nad 35 let je indikací k tomuto vyšetření. Cytogenetické metody pomáhají včas odhalit u plodu chromosomové aberace mající výrazný vliv na abnormální vývoj plodu. Provádějí se také postnatální cytogenetická vyšetření u dětí se zjevnými vývojovými vadami, kdy je nutné potvrdit či vyvrátit diagnózu. Párům, které mají problém s reprodukcí, můžou metody klinické cytogenetiky pomoci zjistit příčinu neplodnosti nebo častých spontánních potratů. (3)

U onkologických pacientů se analyzuje pomocí cytogenetických metod karyotyp maligní buněčné linie, aby se specifikoval subtyp onemocnění a také aby se stanovila prognóza nemocného. Na tento proces navazuje aplikace optimální léčby. (6)

2.2 Příprava preparátu

K rutinnímu postnatálnímu vyšetření karyotypu z periferní krve se odebírá dostatečné množství krve (2 -5 ml) do zkumavky s heparinem lithným. Nejvhodnější buňky pro kultivaci jsou lymfocyty. Analyzují se také buňky ze solidních nádorů odebrané při operacích nebo buňky plodu či placenty. U pacientů s leukémií je nejvhodnější biopticky odebrat buňky z kostní dřeně. U těchto buněk lze nejlépe zhodnotit karyotyp všech krevních linií. (1, 3, 7)

Buňky pro analýzu chromosomů je nutné kultivovat v růstovém médiu, aby se navodil potřebný stav dělení, a to při 37°C. Doba kultivace se liší v závislosti na odebraném materiálu, zpravidla je v časovém rozpětí 24 - 72 hodin, v případě tkáňových buněk i déle. Některé buňky výjimečně nepotřebují kultivaci, a to zejména pokud mají vysokou schopnost proliferace in vitro. Může se jednat o buňky získané z kostní dřeně či buňky z choriových klků. (1, 3, 7)

Dělení kultivovaných buněk se zastavuje kolchicinem nebo jeho deriváty v počátečním stádiu metafáze mitózy, kdy je možné kondenzované chromosomy nejlépe

zhodnotit. Kolchicin je mitotický jed schopný navázat sena dělicí vřeténka a rozrušit je. Následně se k preparátu přidá hypotonický 0,075 M roztok KCl. Tímto dochází ke zvětšení prostoru v buňce a chromosomy se zde mohou rovnoměrně rozprostřít. Opakovanou fixací roztokem kyseliny octové a metanolu (směs v poměru 3 :1) se zabrání znehodnocení buněčných struktur. Připravená buněčná suspenze je nakapána na speciální podložní sklíčka a poté se zpracovává klasickými cytogenetickými barvicími metodami nebo metodami molekulární cytogenetiky. (1, 6, 8)

3 LABORATORNÍ METODY V CYTOGENETICE

3.1 Klasická klinická cytogenetika

Metody klasické cytogenetiky jsou základem cytogenetických vyšetření a bývají doplněny přesnějšími metodami molekulární cytogenetiky. Nejvíce používané metody v rutinní analýze jsou G-pruhování a C-pruhování. Pomocí pruhovacích technik lze v karyotypu pacienta odhalit kromě početních odchylek také odchylky strukturní, jakými jsou například translokace, inverze, delecce či amplifikace. Zhodnocením a srovnáním jednotlivých pruhů lze určit přítomnou chromosomovou mutaci a její lokalizaci. Preparát se po barvení pozoruje v optickém mikroskopu, kdy je za pomoci snímání obrazu CCD (charge - coupled device) kamerou a příslušného počítačového softwaru sestaven výsledný karyotyp. (1, 9)

3.1.1 Klasické barvení (solid staining)

Přípravený preparát je primárně obarven roztokem Giemsa-Romanowski (Giemsovým roztokem), kdy se chromosomy obarví jednoduše bez pruhování. Tímto způsobem lze u chromosomů diagnostikovat pouze výrazné strukturní změny nebo se takto dají chromosomy spočítat a zařadit dle velikosti a délky ramének do několika skupin. (1)

3.1.2 G - pruhování

G-pruhování je jedna ze základních a nejvíce používaných metod pro rozlišení umístění a typu genetické mutace na chromosomu. Využívá se enzymatického působení trypsinu, kterým se nejprve rozloží proteiny přítomné ve zkoumaném chromosomovém vzorku a následně se celý preparát obarví Giemsovým roztokem. Na každém chromosomu lze poté rozlišit specificky uspořádané světlé a tmavé G -pruhy. V tmavých pružích převládají heterochromatinové úseky chromosomu bohaté na báze A – T (adenin - thymin), zatímco světlé pruhy obsahují více transkripčně aktivní euchromatin a převažují zde báze C – G (cytosin - guanin). (10)

Obrázek 2: G -pruhování chromosomů

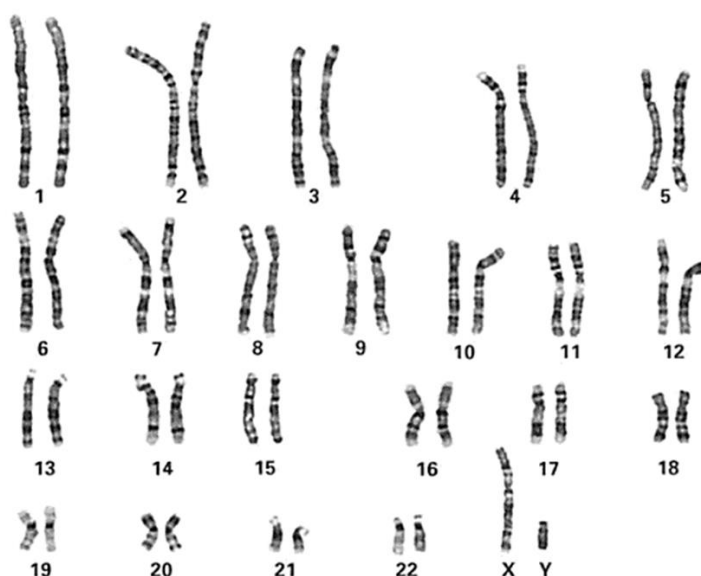


Fig. 2. G-banded human karyogram. (Courtesy of N.L. Chia.)

Zdroj: (11)

3.1.3 Q -pruhování

Q-pruhování je nejstarší pruhovací technika založená na barvení chromosomů roztokem fluorescenčního barviva chinakrinem a následném pozorování pod fluorescenčním mikroskopem, což činí metodu relativně náročnou na přístrojové vybavení. Uspořádání pruhů je podobné jako u G -pruhování, nejjasněji však svítí oblasti bohaté na báze A–T a také oblast na chromosomu Y. Tato metoda se v dnešní době se příliš neuvžívá, preparáty se obtížně pozorují, neboť fluorescence na chromosomech rychle slábne. (10)

3.1.4 R -pruhování (reverzní)

Při reverzním pruhování jsou chromosomy nejprve vloženy do horkého roztoku fosfátového pufru a následné barvení probíhá Giemsovým roztokem. Pruhy se barví opačně než u G -pruhování. Metoda se využívá k zobrazení telomerických oblastí na koncích chromosomů, které jsou při G -pruhování světlé a tudíž obtížně rozlišitelné. (10)

3.1.5 C -pruhování

Chromosomové preparáty se nejprve nechají ošetřit v prostředí hydroxidu barnatého a poté jsou barveny Giemsovým roztokem. Tato technika tmavě zvýrazní oblasti konstitutivního heterochromatinu v blízkosti centromer všech chromosomů a umožňuje dobře studovat výrazné polymorfni bloky konstitutivního heterochromatinu na

chromosomech 1, 9, 16 a Y. Tímto způsobem lze také ověřit přítomnost dicentrických chromosomů nebo výskyt neidentifikovatelných marker chromosomů. (1, 10)

3.1.6 NOR staining (Nucleolar organizer regions staining)

Nucleolar organizer regions (NOR) jsou satelitní oblasti akrocentrických chromosomů s přítomnou ribozomální ribonukleovou kyselinou (rRNA). Obarvení těchto oblastí probíhá roztokem dusičnanu stříbrného. Metoda je vhodná pro stanovení změn na akrocentrickém chromosomu nebo pro určení přítomnosti marker chromosomů. (10)

3.1.7 Metoda HRT (High resolution technique)

Základem metody HRT je barvení chromosomů nejčastěji v prometáfázi, neboť v této fázi jsou chromosomy více rozvolněné. Tímto způsobem je možné ve výsledku rozlišit na chromosomu větší množství jednotlivých pruhů, a proto je tato metoda vhodná pro diagnostiku jemných a jinak hůře rozpoznatelných odchylek. (3)

3.2 Molekulární cytogenetika

Od 70. let 20. století, kdy proběhly první studie a pokusy, se stále častěji v klinické diagnostice uplatňují metody molekulární cytogenetiky. Bývají přesnější než klasické metody barvení. Používá se metoda hybridizace „in situ“ (na místě) a na tomto způsobu jsou založeny její varianty – FISH, mFISH, SKY, mBAND, CGH a array CGH. Zmíněné metody jsou více náročné na technické vybavení než metody klasické cytogenetiky. (1, 10)

Výhodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) metody je, že není nutná izolace DNA. Chromosomové aberace se mohou zjišťovat přímo na vzorku („in situ“) obsahujícím celá buněčná jádra. Kromě klasických cytogenetických preparátů se může jednat i o histologické řezy. Na rozdíl od klasických metod cytogenetiky, je možnost molekulárně-cytogenetické analýzy používat i na nekultivované či nedělící se buňky v interfázi. Molekulárně cytogenetické metody jsou velmi citlivé i na jinak obtížně detekovatelné chromosomové změny, a to díky používání značených DNA sond v řádu kilobází. Sondy jsou jednořetězcové úseky DNA, které se váží přímo ke hledané komplementární sekvenci na patientské DNA. Tímto způsobem je možné určit i translokace, které není možné odhalit jinými metodami. Molekulární cytogenetika navíc pomáhá při léčbě hematologických malignit odhalit přítomnost minimální reziduální nemoci, která může mít negativní vliv na prognózu pacienta. (5, 12)

3.2.1 Obecný princip metod založených na in situ hybridizaci

Působením zvýšené teploty (kolem 90-100°C) a dalších činidel denaturujeme vyšetřovanou DNA i sondu, přičemž v DNA dojde k rozrušení vodíkových můstků a oddělení vláken. Tímto je vyšetřované vlákno připraveno pro komplementární spojení (hybridizaci) s uměle připravenou sondou. Poté je nutné směs ochladit a navodit proces opětovného spojení vláken. K tomuto kroku je třeba připravit sondu v dostatečné koncentraci a velikosti, aby se na vlákno DNA napojila dříve než druhý řetězec. Speciálními roztoky se odstraní přebytečné nehybridizující sondy. Navázání označené sondy na daný úsek DNA je provázáno hybridizačním signálem. Kromě sond se fluorochromem barví také pozadí, nejčastěji se aplikuje DAPI (4', 6-diamidin-2-fenylindol) -fluorescenční barvivo, jehož vyzařovaná spektra musí být odlišná od barevných spekter sond. Sondy a jejich příslušné signály se liší podle toho, zda jsou označeny fluorescenčními barvivy nebo pomocí radioaktivních izotopů. Obraz je zachycen fluorescenčním mikroskopem a přes CCD kameru je převeden do počítače, kde je výsledek zpracován v příslušném softwaru. (1, 6)

3.2.2 Sondy

Sondy jsou laboratorně připravené úseky nukleových kyselin. Prvním typem jsou sondy, které hybridizují s repetitivními sekvencemi α a β -satelitní DNA na centromerách chromosomů, tzv. centromerické sondy. Tímto způsobem lze detekovat numerické odchylky chromosomů i u interfázních jader. Sondy lze použít také pro zachycení repetitivních úseků na telomerách nebo na chromosomu Y. (8, 10)

Druhým typem jsou sondy celochromosomové (malovací, painting probes). Pomocí těchto sond lze označit celý chromosom, a tak je možné zaznamenat u chromosomů v metafázi odchylky ve struktuře, jako jsou například translokace nebo inserce části jiného chromosomu. (8)

Třetím typem jsou sondy pro určení jedinečných sekvencí DNA, které je možné použít i na DNA v interfázi, tzv. lokus-specifické sondy. Hybridizují s konkrétním místem na chromosomu. S jejich pomocí je možné diagnostikovat mikrolece a stanovit mikroleční syndromy, dále je lze využít pro stanovení různě velikých amplifikací či translokací. (8)

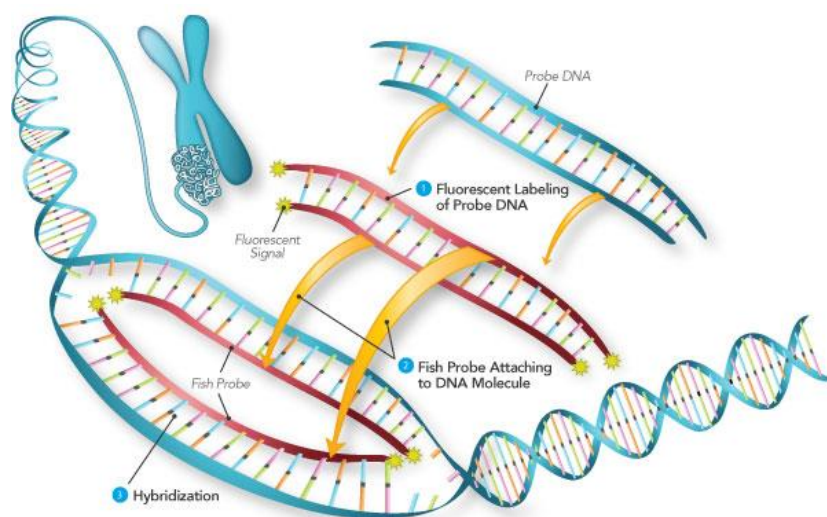
Rozlišujeme několik typů sond dle vektoru, prostřednictvím kterého jsou klonovány. Požadovaný úsek DNA, který je nutno namnožit, se vloží do daného klonovacího vektoru. V plazmidech se klonují úseky DNA o velikosti 10 až 22 kbp

(kilobase pair). Sondy o velikosti 15 až 25 kbp jsou klonovány pomocí bakteriofága. Pro delší úseky se používají fágomidy, fasmidy a kosmidové sondy. Dále je možné použít bakteriální chromosomy či fágové umělé chromosomy, se kterými lze klonovat úseky DNA až o délce 300 kbp. Pro velké sondy o velikosti 200-2000 kbp je možno použít umělých kvasinkových chromosomů. Tyto celkem časově náročné klonovací postupy dokáže v současnosti zastoupit metoda polymerase chain reaction (PCR) nebo je možné některé kratší sondy synteticky vyrobit. (1)

3.2.3 FISH (Fluorescence in situ hybridization)

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH), viz obrázek č. 3, je jedna z běžně používaných metod ve výzkumu i v rutinních vyšetřeních. Bývá často součástí klasických cytogenetických vyšetření, anebo je může v určitých případech nahradit. Používají se sondy značené fluorescenčními barvivy. Nevýhodou této metody je, že se musí předpokládat určitá chromosomová změna, ke které se bude komplementární sonda vázat. Na jeden pokus je možné použít pouze několik sond. Pro analýzu kompletního karyotypu je „klasická“ FISH nevhodná, neboť je obtížné zachytit více úseků DNA na vyšetřovaném vzorku během jednoho stanovení. Tento nedostatek je v dalších metodách alespoň zčásti odstraněn. Naopak k výhodám tohoto vyšetření a dalších vyšetření na této bázi patří možnost analyzovat buňky nekultivované a v interfázi nebo hodnotit velké počty buněk, a to v řádech stovek nebo tisíců. (1)

Obrázek 3: Grafické znázornění principu FISH (Fluorescence in situ hybridization)



Zdroj: (13)

3.2.4 M-FISH (Multicolor fluorescence in situ hybridization)

Pro barevné odlišení každého páru z 24 lidských chromosomů existuje několik kombinací 5 fluorochromů, kterými jsou sondy značené. Aby tato analýza fungovala, je třeba buňky kultivovat a zastavit dělení v metafázi. Metoda nedokáže zachytit aberace uvnitř chromosomu a je tedy vhodná k identifikaci rozsáhlejších přestaveb mezi chromosomy, jako jsou translokace nebo inserce. K vyhodnocení je použit fluorescenční mikroskop, který rozliší obraz různými filtry. Pomocí 6 filtrů dochází k separaci signálů každého fluorochromu, včetně odlišení pozadí. Celý výsledek je snímán CCD kamerou, ta je schopná převádět obraz do počítače a pomocí speciálního softwaru jsou chromosomům přiděleny tzv. klasifikační barvy, které zajistí lepší rozlišení pro diagnostiku změn v karyotypu. (1, 6)

3.2.5 SKY (Spectral karyotyping)

Obdoba metody M-FISH s podobným výsledkem, kdy dojde k vytvoření barevného karyotypu pomocí hybridizace 24 barevných sond vzniklých kombinací 5 fluorochromů s chromosomy. Na rozdíl od M-FISH je zde použit pouze jeden filtr a emisní spektrum, které je charakteristické pro každou sondu. Signál prochází interferometrem a přes CCD kameru se poté se zpracovává v počítači, kde jsou jednotlivým chromosomovým párům přiděleny klasifikační barvy. (6, 12)

3.2.6 M-BAND (Multicolor banding)

K metafázním chromosomům jsou přiřazeny komplementární odlišně zbarvené malovací sondy, schopné hybridizovat pouze s krátkými úseky DNA na chromosomu. Každý chromosom má tedy několik barevných oddílů. Výhodou u tohoto značení oproti předchozím technikám je možnost detekovat intrachromosomové změny (delece nebo zmnožení). (1)

3.2.7 Chromosomová CGH (Comparative genome hybridization)

Metoda komparativní genomové hybridizace vychází z principu srovnání signálů mezi patientskou DNA a signálem referenční DNA normálního jedince. Každá z těchto DNA je označena jiným barveným fluorochromem a obě reprezentují v tomto případě sondy. Po vzájemné hybridizaci obou těchto DNA úseků s normálními chromosomy se zjišťuje, zda nepřevládá jedna z barev. Tímto je možné zjistit na vyšetřované DNA možné delece nebo amplifikace. Preparát či vzorek připravený pro tuto metodu není nutné kultivovat. (1, 6)

3.2.8 Array CGH

Na podobném základě jako CGH funguje i tato tzv. čipová technika (array). Jako sondy slouží v případě array CGH také vyšetřovaná a referenční DNA. Hybridizují s jednotlivými referenčními úseky DNA fixovaných na podložním skle. Výsledky vyhodnocuje počítačový software dle lokalizace genu na mřížce podložního skla. Tímto způsobem je možné zjistit delece nebo amplifikace s velkou přesností na větším počtu genů, čehož se využívá např. při odhalování nebalancovaných přestaveb v genomu u hematologických pacientů. (1, 6)

4 LEUKÉMIE

První záznam o pacientech s leukémií se objevil již v 19. století. Na začátku 20. století proběhly první pokusy léčby radioterapií a po 2. světové válce se začala vyvíjet léčba pomocí chemoterapeutik, která se v dnešní době stále zdokonaluje.

Leukémie jsou hematologické malignity krve vycházející z lymfoidní nebo z myeloidní hematopoetické řady. Postižené jsou bílé krvinky, které jsou defektní a zůstávají vývojově obvykle ve formě blastů či jiném méně zralém stádiu. V této formě neplní dostatečně svoji funkci, nadměrně proliferují, avšak nediferencují se do dalších stádií a utlačují tak tvorbu ostatních krevních komponent. Pacient se cítí oslabený a je více náchylný na různé infekce, jejichž následky mohou být fatální. Proto je zásadní začít léčit nemocného co nejdříve. Existuje několik základních skupin leukémií, ve kterých rozlišujeme podskupiny typu chronické nebo akutní leukémie. Akutní leukémie mají obvykle rychlý a výrazný průběh a naopak chronické leukémie mají pomalý nástup projevů a často uplyne dlouhá doba, než je potřeba případnou léčbu vůbec zahájit. Může se jednat o léčbu samotné příčiny leukémie, anebo pouze o léčbu symptomů. (14)

4.1 Krvetvorba

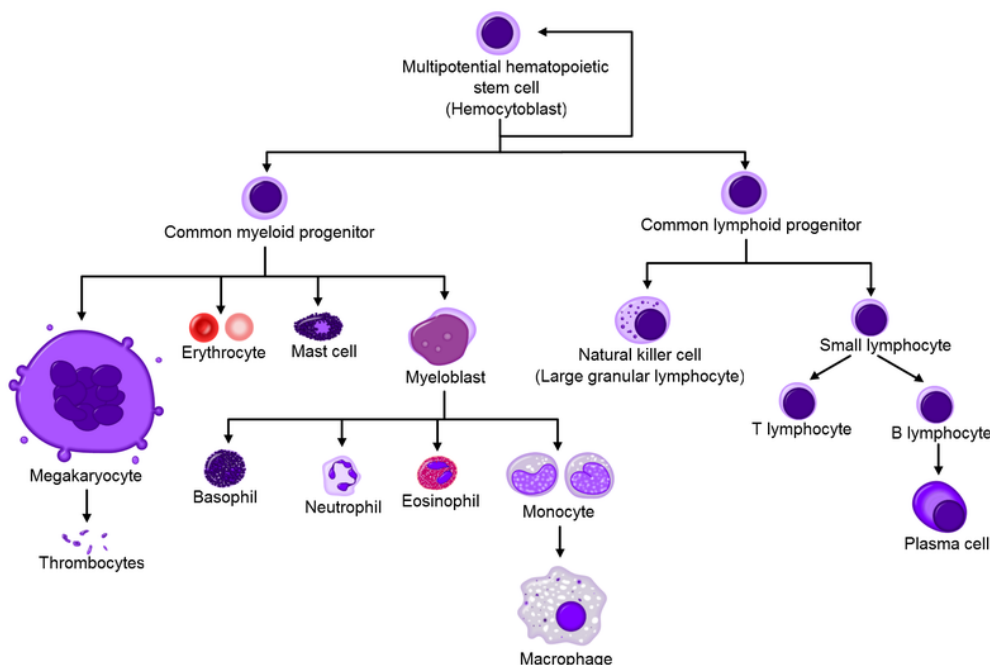
V prenatálním období se krvetvorba odehrává primárně ve žloutkovém vaku, odkud se s postupným vývojem orgánů přesouvá do jater a sleziny. Od 20. týdne se krvetvorba plodu soustředí do kostní dřeně, kde za fyziologických podmínek probíhá celý život. Z multipotentních kmenových buněk v kostní dřeni se krevní elementy vytváří z několika linií. Vývoj jednotlivých elementů je zobrazen na obrázku č. 4. (15)

Z lymfoidní linie vznikají T a B -lymfocyty, jež jsou součástí specifické imunity. Dále se z této linie vyvíjejí natural killer (NK) buňky patřící k nespecifické složce imunity. Z B -lymfocytu se po setkání s antigenem stává plazmatická buňka produkující specifické protilátky proti tomuto antigenu. Pomocné T -lymfocyty produkují po setkání s antigenem cytokiny, kterými stimulují zejména B -lymfocyty. Cytotoxické T -lymfocyty dokáží suprimovat či jinak regulovat imunologické reakce a také jsou schopny likvidovat poškozené buňky. Z mnoha B i T -lymfocytů se stávají paměťové buňky, které zajistí, aby při dalším setkání s antigenem byla odpověď organismu co nejrychlejší. (15, 16).

Myeloidní řada buněk zahrnuje kromě nejvíce zastoupených erytrocytů a krevních destiček také monocyty, dendritické buňky a tři typy granulocytů: neutrofilů, bazofilů a eozinofilů. Monocyty z krve putují do tkání, kde se diferencují v makrofágy, schopné

fagocytózy. Oba tyto typy buněk patří do systému antigen prezentujících buněk, které vystavují antigen na svém povrchu lymfocytům. Proti extracelulárním patogenům působí v první řadě neutrofil, které jsou schopné pomocí cytosinů aktivovat řadu dalších buněk. Při alergických reakcích se uplatňují převážně bazofily a hodnoty eozinofilů jsou zvýšené hlavně při parazitárních infekcích. (16)

Obrázek 4: Krvetvorba



Zdroj: (17)

4.2 Příčiny vzniku leukémií

Vznik jednotlivých typů leukémií může být ovlivněn mnoha faktory, ale u některých forem nebyla zatím jasná příčina vůbec odhalena. Bylo zjištěno, že riziko vzniku akutní leukémie je vyšší u pacientů s některými vrozenými genetickými onemocněními, jako je například Fanconiho anémie a také Downův či Bloomův syndrom. Většina případů onemocnění souvisí s expozicí zevním faktorům, jakými jsou chemická rozpouštědla nebo dnes už zřídka používaný azbest a jiné toxické látky. Ke vzniku leukémií může také vést předchozí cytostatická léčba. Akutní i chronické formy leukémie se často objevují u osob vystavených ionizujícímu záření, ať už pravidelně v zaměstnání nebo po jaderných haváriích. Následkem těchto faktorů může dojít ke genetickým mutacím, které mohou zapříčinit nekontrolovatelné množení buněk. Jedná se například

mutace, kdy dojde k vyřazení důležitých genů, které mají na starost kontrolu buněčného cyklu. (6, 14, 18)

4.3 Diagnostický postup a princip léčby leukémií

Pro diagnostikování leukémií je velmi důležité primárně vyhodnotit krevní obraz a výsledek diferenciálního krevního rozpočtu. Jedním z rozhodujících ukazatelů je počet nezralých blastů a počet leukocytů v krvi. Referenční mezí pro leukocyty je počet $4,0 - 10,0 \times 10^9/l$. Leukopenií je nazýván stav, kdy je počet leukocytů snížený. O leukocytózu se jedná, pokud je jejich počet zvýšený. (15, 19)

Dále se odebrává pacientova kostní dřev (nejčastěji ze sterny) a tento vzorek se hodnotí cytologicky a cytochemicky. Na tyto diagnostické postupy poté navazují další specifická vyšetření, jako je imunofenotypizace leukocytů pomocí průtokové cytometrie, která má velmi důležitou úlohu ve stanovení a diferenciaci subtypů leukémií. Stále více se však využívají cytogenetické a molekulárně-genetické metody. Těmito způsoby je možné upřesnit diagnózu pacienta a také postup léčby a prognózu onemocnění. (19)

„Cílem léčby leukémií je vždy navodit kompletní remisi, to znamená normalizaci hodnot krevního obrazu a normalizaci velikosti lymfatických uzlin, jater i sleziny.“ (19, str. 188).

Léčba může tedy navodit kompletní i parciální remisi a stav pacienta je i po úspěšné léčbě dlouhodobě sledován z důvodu včasného zásahu v případě relapsu onemocnění. (19)

4.4 Akutní myeloidní leukémie (AML)

4.4.1 Obecná charakteristika onemocnění

Akutní myeloidní leukémie (AML) zahrnuje několik menších podskupin leukémií klasifikovaných dle World Health Organization (WHO) podle jejich krevního obrazu a cytogenetického nálezu. U dospělé populace zastupuje tento typ leukémie téměř 80 % všech akutních forem leukémií a je prokázáno, že se vzrůstajícím věkem incidence AML stoupá. (19)

Leukémie tohoto typu je charakteristická zvýšeným počtem nezralých myeloblastů v kostní dřevě, šířících se až do periferní krve. Nezralé leukemické blasty se vymykají kontrole, nadměrně proliferují, ale nediferencují se do dalších vývojových stádií. Tvorba ostatních krevních komponent je tímto výrazně snížena. V krevním obraze lze nalézt

výraznou trombocytopenii a snížený počet granulocytů. Jako AML lze označit stav, kdy počet nezralých blastů v kostní dřeni převyší 20 % a počet blastů v periferní krvi převyší 5 %. Počet leukocytů v krvi bývá zvýšený, může přesáhnout počet $100 \cdot 10^9/l$, ale není to pravidlem. (20)

Četné příznaky AML, podobně jako u jiných akutních forem leukémií, se začnou projevovat ve velmi krátkém časovém intervalu, přičemž nemocný se mohl cítit předtím zcela zdrav. Z důvodu sníženého počtu erytrocytů se pacient cítí slabý a je zřetelně anemický. Je potlačena tvorba trombocytů a v této souvislosti se objevuje krvácení bez příčiny od drobných petechií až po rozsáhlejší krvácivé projevy. Defektní leukocyty nezabezpečí dostatečnou imunitu a pacient trpí častými infekcemi. Kromě těchto výrazných projevů může onemocnění provázet ještě mnoho dalších, například horečnaté stavy či noční pocení. (19, 20)

4.4.2 Cytogenetické změny

U 60-90% nemocných s AML lze nalézt mutace v genomu kmenových buněk. Mutace způsobí aktivaci nádorových onkogenů a naopak může být narušená funkce tumor-supresorových genů. Lepších prognostických výsledků dle National Comprehensive Cancer Network (NCCN) dosahují pacienti s translokací $t(15;17)$, $t(8;21)$, $t(16;16)$ a inverzí $inv(16)$. Doba přežití je u 55-65% pacientů s příznivým cytogenetickým nálezem alespoň 5 let a více. Naopak velmi nepříznivý je karyotyp s monosomálními chromosomy (-5, -7) nebo s delecí na chromosomech 5q a 7q, což jsou změny sekundární, které nastupují až v dalších fázích nemoci. Špatnou prognózu mají také translokace zahrnující 11q23, translokace $t(6;9)$ a $t(9;22)$. (20, 21)

4.4.3 Léčba

Léčba AML se liší převážně dle věku, fyzického stavu postiženého a cytogenetických nálezů. Obtížně se léčí hlavně starší pacienti nad 60 let. Snahou chemoterapeutické léčby v indukční fázi je dosažení remise, a to redukcí počtu nádorových buněk v kostní dřeni na minimum za účelem obnovy fyziologické krvetvorby. Po této fázi následuje konsolidační udržovací léčba zajišťovaná převážně vysokými dávkami chemoterapeutik. (21)

Pacientům je v mnoha případech indikováno podstoupit autologní transplantaci, nebo alogenní transplantaci kmenových buněk kostní dřene. Tyto metody léčby dokáží prodloužit medián přežití. Úspěšnost léčby je nízká, naději na dlouhodobé přežití má

zhruba 30-40 % pacientů, u starších pacientů je to pouze 10 % z celkového počtu nemocných. (6, 21)

4.5 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

Dle WHO se akutní lymfoblastické leukémie (ALL) rozdělují do tří hlavních skupin, kterými jsou pre-B -buněčná ALL, zralá B -buněčná ALL a T -buněčná ALL. Nejvíce postižených ALL je v dětském věku, s přibývajícím věkem incidence klesá, ale po 60. roce opět nemocných přibývá. (19)

4.5.1 Obecná charakteristika onemocnění

V tomto případě dochází k nadměrné produkci nádorových blastů pocházejících z lymfoidní linie v kostní dřeni. Blasty se ve dřeni hromadí a poté se v hojném počtu mohou objevit i v periferní krvi. O ALL se hovoří, pokud množství lymfoblastů ve dřeni převyšuje 20 %. Proliferuje nejčastěji B -řada lymfocytů, kdy B -ALL tvoří až 80 % všech případů. V periferní krvi jsou obvykle snížené počty trombocytů i granulocytů. ALL je často doprovázena leukocytózou v počtu nad $100 \cdot 10^9/l$. (19, 20, 21)

Příznaky této nemoci jsou obdobné jako u akutní myeloidní leukémie, s tím rozdílem, že zákeřnost ALL spočívá také v schopnosti mnohem více infiltrovat maligními blasty také další orgány, a to zejména játra, lymfatické uzliny, ale i centrální nervový systém. U T -ALL formy se také často objevují tumory v oblasti mediastina. (19, 20)

4.5.2 Cytogenetické změny

Kromě věku se na prognóze podílejí cytogenetické změny, které lze nalézt až u 85 % nemocných. Nepříznivé pro delší přežití jsou translokace postihující gen *MLL* (11q23). Velmi často se objevují translokace t(8;14) nebo t(4;11). Největší význam má však translokace t(9;22)(q34;q11), při které vzniká Filadelfský chromozom, na němž se nachází fúzní gen *BCR/ABL1*. Přítomnost genu *BCR/ABL1* u B -ALL predikuje špatnou odpověď na léčbu a je zde zvýšené riziko relapsu onemocnění. (19, 20, 21)

4.5.3 Léčba

Indukční fáze léčby je zajištěna několika cykly cytostatik, kortikoidy a enzymem asparaginázou. Po kompletní remisi následuje konsolidační léčba, obvykle doprovázená ozařováním centrální nervové soustavy (CNS). Nakonec je nutné udržovat pokračující léčbu, aby se zabránilo relapsu choroby. Pokud není odpověď organismu na cytostatickou

léčbu dostatečná a pacient je ohrožen rizikovou formou ALL, přichází v úvahu autologní i alogenní transplantace kostní dřeně. (21)

Prognóza onemocnění je více příznivá spíše u dětí s ALL, kdy 80% zůstává v dlouhodobé remisi i po třech letech. Rozdílné jsou výsledky u lidí nad 55 let, kdy se déle než 3 roky dožije pouze 20% pacientů. Dlouhodobé remise nastávají spíše u zralé buněčné B -ALL a T -ALL. (20, 21)

4.6 Chronická myeloidní leukémie (CML)

4.6.1 Obecná charakteristika onemocnění

Chronická myeloidní leukémie (CML) se projevuje zpočátku velmi nespecificky, ale téměř v polovině případů se nemoc nemusí projevit vůbec. Pacient se cítí unavený, ubývá na váze a objevují se zvýšené teploty. Nemoc lze rozpoznat také dle značně zvětšené sleziny či jater. Ve fázi blastického zvratu se CML ve svých příznacích plně projeví jako akutní leukémie. (19)

Chronické onemocnění postihující myeloidní řadu krevních buněk. Nemoc graduje ve třech fázích. První je chronická fáze trvající zhruba 3-5 let. V krvi se nachází vyšší počet leukocytů od $20-500 \cdot 10^9/l$. Typické pro CML jsou také zvýšené počty bazofilů, eozinofilů a v periferní krvi lze nalézt posun doleva s rozmanitými nezralými formami granulocytů. Bývají zmnožené i ostatní buňky krevní řady. Na ní navazuje fáze akcelerace (4-6 měsíců), se stoupajícím počtem blastů a také bazofilů. V poslední fázi, zvané blastický zvrát, tvoří blasty přes 30 % elementů kostní dřeně nebo periferní krve. (14, 19, 21)

4.6.2 Cytogenetické změny

U nemocných je typickým cytogenetickým nálezem Filadelfský chromosom, na kterém se nachází fúzní gen *BCR/ABL1*, vzniklý translokací genů mezi chromosomy 9 a 22. V karyotypu buněk se při progresi onemocnění mohou objevit i další početní a strukturní mutace, jako je například vznik izochromosomu 17, trisomie chromosomu 8, monosomie chromosomu 7 nebo může dojít k menším či větším delecím na některých chromosomech. (6)

4.6.3 Léčba

V léčbě CML mají zásadní význam cytostatika, jenž inhibují aktivitu tyrozinkinázy *BCR/ABL1* v cílových leukemických buňkách. Déle než pěti let se dožije více než 75 %

léčených pacientů. Tato léčba je u vhodných pacientů doplněna alogenní transplantací buněk kostní dřeně. Alogenní transplantace je prozatím jediným potencionálním řešením, které vede v mnoha případech k úplnému vyléčení z CML. Pokud se léčba ve fázi blastického zvratu nezahájí včas, smrt nastává v období několika dnů či týdnů. (19, 22)

4.7 Chronická lymfocytární leukémie (CLL)

4.7.1 Obecná charakteristika onemocnění

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je onemocnění, jehož průběh je velmi variabilní a nemusí být tak agresivní jako jiné formy leukémií. Prozatím nebyla upřesněna konkrétní příčina či okolnost vzniku této formy leukémie, bylo však pozorováno, že v některých rodinách je její přítomnost častější. CLL je velmi časté onemocnění, tvoří více než 25 % všech případů leukémií u dospělých jedinců v naší populaci. Nemocní bývají starší 50 let, a to až v 90 % případů. Muži jsou postiženi téměř dvakrát častěji než ženy. (20, 22)

Incidence v letech 2008 až 2012 dle statistik National Cancer Institute (NCI) ve Spojených státech amerických činila 4,5 nově hlášených případů CLL na 100 000 obyvatel za rok. (23)

V České republice je incidence tohoto onemocnění ve srovnání s USA o něco vyšší, incidence CLL je zde okolo 5,8 až 6,2 případů na 100 000 obyvatel za rok. (21)

Chronická lymfocytární leukémie může být objevena náhodně a mnoho let tedy může probíhat bez příznaků, pouze se zvýšenými hodnotami lymfocytů v krvi. V případě CLL se jedná o postižení B -lymfocytární řady. B -lymfocyty proliferují nadměrně, mají sníženou schopnost apoptózy a utlačují tvorbu ostatních komponent. Symptomy v pozdější fázi onemocnění jsou různé. Zpočátku jsou infiltrované lymfatické uzliny a slezina, což se projeví jejich nápadným zvětšením. Infiltrace se později týká i nelymfatických orgánů, jako je kůže, prostata či játra. V pokročilém stádiu s přibývajícím počtem maligních lymfocytů se objevují další celkové příznaky, jako je anémie, či snížený počet krevních destiček. Toto stádium doprovází zvýšená teplota, únava, zvýšené noční pocení a postupný nápadný úbytek váhy. Pacienti mají kvůli nedostatku T -lymfocytů a NK buněk sníženou imunitu a jsou více náchylní k různým infekcím. (19)

4.7.2 Diagnostika

„Diagnóza CLL je potvrzena, najdeme-li v periferní krvi více než $5 \cdot 10^9/l$ lymfocytů typického fenotypu, který prokazuje klonalitu onemocnění. Buňky CLL exprimují typickou kombinaci antigenů CD5, CD19 a CD23. Exprese povrchových imunoglobulinů je nízká, stejně tak je nízké i exprese antigenů CD20 a CD79b.“ (21, str. 81)

Na základě toho, zda postižené nádorové buňky prošly germinálním centrem, či nikoliv, je možné rozlišit dvě formy CLL. První forma CLL vzniká z buněk, které neprošly tímto centrem a nejsou zasaženy mutací genu V_H pro těžké řetězce imunoglobulinů. Tyto lymfocyty mají zachovanou vysokou expresi antigenu CD38 a proteinu ZAP-70, což značí agresivnější formu nemoci s kratší dobou přežití. Druhá forma onemocnění vzniká z buněk prošlých germinálním centrem a lze u nich identifikovat mutaci genů V_H . U této méně agresivní formy je naopak doba přežití průměrně 20 let. (19, 20)

4.7.3 Cytogenetické změny

Prognóza pacienta i léčba pacienta, u kterého je diagnostikována chronická lymfocytární leukémie závisí na mnoha faktorech, jedním z významných faktorů jsou i cytogenetické změny. Cytogenetické změny se mohou diagnostikovat pomocí metod klasické i molekulární cytogenetiky. Nevýhodou u klasických metod je, že odpověď na mitogeny je u lymfocytů CLL slabá, proto je mnohdy lepším řešením užívat metod molekulární cytogenetiky (FISH) aplikovatelné i na interfázní jádra. Nejčastější chromosomální změnou u CLL je delece 13q14, která bývá nalezena u 36–55 % nemocných. Dále se u zhruba 20 % pacientů vyskytuje delece 11q a u 16 % pacientů se objevuje trisomie 12. chromosomu. U 6 % pacientů se vyskytuje delece 17p. (24)

Delece 13q14

Nejčastější chromosomovou mutací, která byla nalezena až u 50 % pacientů s CLL, je delece 13q14. Tato mutace má jednu z nejlepších prognóz. Pacienti se samostatnou mutací 13q mají šanci na přežití delší než 15 let, nemoc se u nich projevuje postupně a v mírnější formě. Ve třetině případů je tato mutace doprovázena ještě delecí 11q, delecí 17q či trisomií chromosomu 12. (20, 24, 25)

Delece 17p13.1 (gen *TP53*)

Velmi špatnou prognózu s minimální odpovědí na léčbu mají pacienti s delecí 17p13.1, zahrnující gen *TP53* (tumor protein), vyskytující se jako samostatná mutace zhruba u 7 % nemocných. Aby byl gen *TP53* inaktivován, musí dojít ve většině případů k poškození obou alel genu. Změny na genech *TP53* a *ATM* podléhají selekčnímu tlaku v nádorových buňkách a zřídka se objevují současně. (6, 19, 25)

Delece 11q23 (gen *ATM*)

Další častou aberací se špatnou prognózou je delece 11q22.3. Tato delece je společně s delecí 17p charakterizována rychlou progresí a velmi krátkým časovým intervalem mezi záchytem onemocnění a začátkem léčby. Při této chromosomové změně dochází k poškození genu *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), který se v této oblasti chromosomu nachází. Produktem tohoto genu je *ATM* protein, který bývá produkován při poškození DNA. *ATM* protein fosforyluje protein *tp53*, který indukuje v buňce řadu opravných mechanismů či spouští apoptózu buňky. Pokud je tedy tento gen deletován, může to být příčinou nekontrolovatelného množení buňky. U třetiny nemocných delecí jedné alely *ATM* může být druhá alela genu *ATM* mutována, což má prokazatelně za následek kratší dobu přežití. Mutace druhé alely má za následek narušení funkcí proteinu *ATM*. (25, 26)

Trisomie chromosomu 12

Trisomie 12 bývá spojována s agresivnějším průběhem a kratší dobou přežití, ale dle současných studií je charakterizována jako mutace s méně závažnou či střední prognózou. Zatím není zcela jasné, který významný gen je v případě této mutace zasažen. (6, 27)

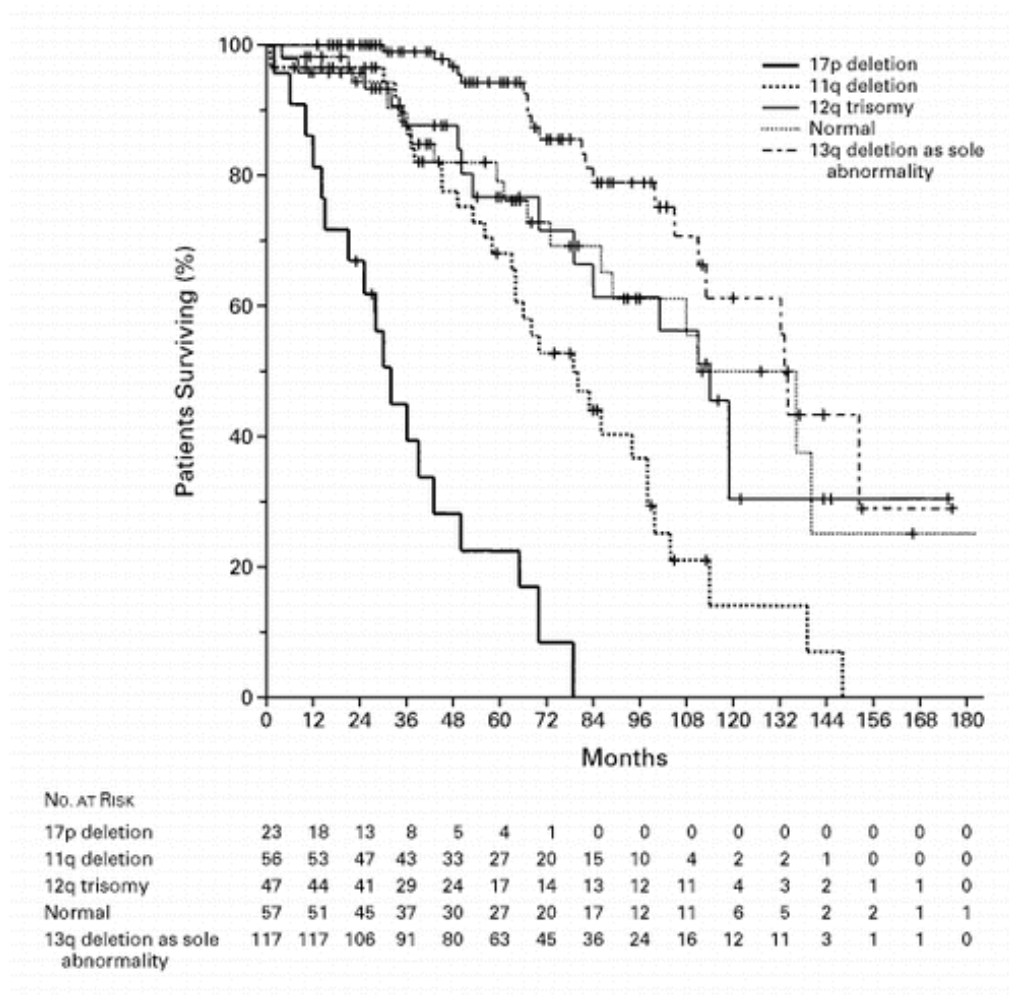
Delece 6q

V karyotypu pacientů se v nižší frekvenci může objevit samostatně nebo společně s další mutací delece 6q (6q21, 6q23). Pro tuto delecii jsou charakteristické zvýšené hodnoty lymfocytů, lymfadenopatie a výskyt větší nádorové masy buněk. Delece 6q prozatím nebyla spojena s žádným typem prognózy. (28)

Medián přežití u jednotlivých aberací

Dle výsledků studií je medián přežití od počátku záchytu CLL odlišný v závislosti na cytogenetické změně. U pacientů s delecí 13q je medián přežití 133 měsíců; u pacientů s delecí 17p je medián přežití nejkratší, a to 32 měsíců; u pacientů s delecí 11q je medián přežití 79 měsíců a u pacientů s trisomií 12 je medián přežití 144 měsíců. U pacientů s normálním karyotypem je medián přežití 111 měsíců. Tyto změny jsou zachyceny v grafu na obrázku č. 5. (25)

Obrázek 5: Medián přežití u pacientů s CLL



Zdroj : (25)

4.7.4 Klasifikace CLL

Chronická lymfocytární leukémie se rozděluje do několika stádií, které charakterizovali Rai a Binet. Dle tabulek, které sestavili, je možné stanovit prognózu

onemocnění. Původní tabulka dle Raie má novou modifikovanou verzi a obsahuje nyní pouze 3 skupiny rozdělené dle rizika. (18).

Tabulka 1: Klasifikace CLL do stádií dle Raie

Stádu (modifikovaný Rai)	Definice	Medián přežití (měsíce)
0 (nízké riziko)	Pouze lymfocytóza v krvi a v kostní dřeni	140
I (střední riziko)	Stádium 0 se zvětšenými uzlinami	100
II (střední riziko)	Stádium 0 -I se splenomegalií či hepatomegalií	70
III (vysoké riziko)	Stádium 0 -II s anémií (hemoglobin < 11g/dL nebo hematokrit pod 33%)	20
IV(vysoké riziko)	Stádium 0 -III s trombocytopenií	20

Zdroj (upraveno a převzato) : (29)

Tabulka 2: Klasifikace B -CLL do stádií dle Bineta

Stádium	Definice
A	Hemoglobin \geq 10g/dL, trombocyty \geq 100,000/mm ³ , postižené jsou tři a méně oblastí *
B	Hemoglobin \geq 10g/dL, trombocyty \geq 100,000/mm ³ , postižené jsou tři a více oblastí *
C	Hemoglobin < 10g/dL, trombocyty <100,000/mm ³ , postižené je libovolné množství oblastí*

*Jako jednotlivé oblasti se považují: uzliny hlavy a krku včetně Waldeyerova okruhu, axilární uzliny (obě strany se počítají jako celek), tříselné uzliny (obě strany se počítají jako celek), splenomegalie, hepatomegalie

Zdroj (upraveno a převzato) : (29)

4.7.5 Léčba

Léčba chronické lymfocytární leukémie bývá ihned zahájena obvykle u pacientů ve stádiu III až IV dle Raie, u nichž se může zdravotní stav rapidně zhoršit ve velmi krátkém čase. Ukázalo se, že zahájení léčebné terapie v klinických stádiích 0 nebo I dle Raie může v některých případech pacientovi naopak přitížit. Pacienti v těchto nižších stádiích jsou většinou pouze pravidelně kontrolováni pro případnou progresi onemocnění a probíhá u nich doprovodná léčba symptomů. Důležité je však u každého stádia přihlížet na klinické projevy nemoci či rychlost progresu a dle nich začít příslušnou léčbu. (14)

Mezi léčebná terapeutika patří glukokortikoidy s nejmenším účinkem (prednison), alkylační cytostatika (chlorambucil), purinová analoga (fludarabin, cyclofosfamid) a také monoklonální protilátky (rituximab, alemtuzumab). Léčba monoklonálními protilátkami, které jsou schopné cíleně způsobit lýzu nádorové buňky vazbou na konkrétní antigen, se v dnešní době aplikuje stále častěji. Pro starší nemocné a komorbidní pacienty je nevhodnější léčbou první linie aplikace chlorambucilu. Alkylační cytostatika mají velmi dlouhý nástup účinků, a tak se stále častěji používá kombinace několika účinných terapeutik, jako jsou COP (vinkristin, cyclofosfamid a prednison) nebo CHOP (vinkristin, adriamycin, cyclofosfamid a prednison). (19, 21, 30)

U nemocných, kteří jsou jinak v dobrém zdravotním stavu, je léčba první linie zahájena obvykle pomocí FCR (fludarabin, cyclofosfamid a rituximab). (21)

Jedinou nadějí na vyléčení pacientů s chronickou lymfocytární leukémií zatím představuje alogenní transplantace buněk kostní dřeně, která je vhodná pouze pro malé procento nemocných s CLL. Tato léčba představuje pro pacienta velké riziko a je spojena s celkem vysokou úmrtností (až 26 %). Transplantace bývá prováděna u mladších pacientů a většinou se jedná o nemocné s horšími prognostickými faktory, například s delecí 17p či s nemutovaným genem pro IgV_H. (24)

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE A ÚKOLY VÝZKUMU

5.1 Cíle výzkumu

1. Sestavit soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) podle zadaných klinických kritérií.
2. Provést základní statistické vyhodnocení sestaveného souboru.
3. Detailně se seznámit s pravidly cytogenetického zápisu dle nejnovější cytogenetické nomenklatury a s těmito znalostmi interpretovat karyotypy několika vybraných pacientů ze souboru.
4. S využitím těchto znalostí analyzovat četnosti výskytu cytogenetických aberací v souboru pacientů a dle těchto aberací rozřídít soubor do několika skupin.
5. Vyhodnotit a porovnat analyzovaná data s údaji z literatury.

5.2 Výzkumné otázky

V této práci byly stanoveny dvě výzkumné otázky: Jaké jsou nejčastější chromosomové aberace vyskytující se u zkoumaného souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií? Odpovídá jejich prognostický význam pro pacienta očekávání?

6 METODIKA VÝZKUMU

Získání souboru cytogenetických výsledků je velmi časově náročné (v řádu let), a proto bylo při zpracování této bakalářské práce umožněno využít data o pacientech vyšetřených v letech 2007 až 2013 ve Fakultní nemocnici v Plzni (FN). Tomuto kroku předcházela žádost o poskytnutí informací z Fakultní nemocnice v Plzni. Databáze cytogenetických vyšetření byla vypracována pracovníky **Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN v Plzni**. Pro vypracování praktické části této bakalářské práce byla zvolena kvantitativní metoda výzkumu. Nejprve jsme sestavili z poskytnutých dat o pacientech s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) dvě rozsáhlé tabulky, přičemž v první tabulce (tabulka č. 3) jsou uvedeny základní údaje o stavu pacienta a informace k příslušné léčbě. Ve druhé tabulce (tabulka č. 4) jsou uvedeny údaje z cytogenetického vyšetření těchto pacientů. Pro zachování anonymity pacientů, bylo každému z nich přiřazeno identifikační číslo. Výsledkem výzkumu jsou závěrečné tabulky a grafy, ve kterých se zabýváme analýzou jednotlivých aberací spolu s příslušnými údaji a jejich významem.

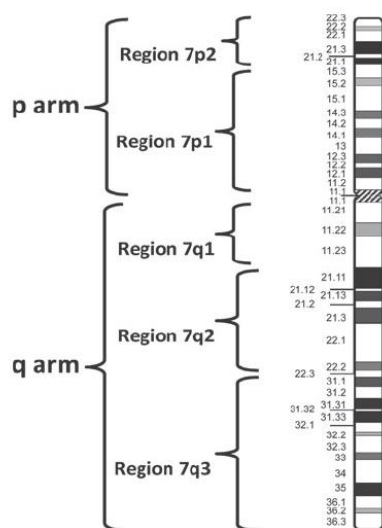
7 CYTOGENETICKÁ NOMENKLATURA

Cytogenetická nomenklatura je celosvětově jednotný rozsáhlý soubor detailních kritérií, dle nichž se určuje a popisuje lidský karyotyp a jeho odchylky. Pro studium karyotypů pacientů bylo nejdříve nutné pochopit a naučit se pravidla zápisu aberací, což bylo jedním z cílů této bakalářské práce. V této kapitole jsou zmíněna základní pravidla dle nejnovější nomenklatury ISCN 2013 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Pro bližší studium cytogenetické nomenklatury je dostupných velmi málo zdrojů psaných českým jazykem a informace byly čerpány zejména ze zahraničních zdrojů.

7.1 Pruhování chromosomů

Aby bylo možné aplikovat cytogenetickou nomenklaturu, je nejprve nutné pomocí pruhovacích cytogenetických technik identifikovat jednotlivé specifické pruhy na každém chromosomu a tímto způsobem tedy odhalit případné odchylky. Pomocí těchto metod je možné rozlišit na chromosomu 300, 400, 550, 700 až 850 pruhů na haploidní sadu chromosomů. Pruhy jsou číslovány od centromery směrem k telomerám a dohromady tvoří několik oblastí (v počtu 1-4) na raménku každého chromosomu. Pro přesný zápis lokace je nutné uvést nejdříve číslo chromosomu, poté druh raménka (p - nebo q -), číslo oblasti a číslo pruhu v této oblasti. Viz obrázek č. 6 níže. Při použití technik s vyšším rozlišením je možné za tento zápis doplnit i sub-pruhy. (10)

Obrázek 6, Ideogram G -pruhování u normálního chromosomu č. 7



Zdroj: (10)

7.2 Normální a patologický karyotyp

V obecném principu zápisu normálního karyotypu je na prvním místě uvedený celkový počet všech chromosomů. Toto číslo je oddělené čárkou (,) od údaje o pohlavních chromosomech. Další informace o karyotypu jsou uvedeny pouze v případě přítomnosti genetických mutací na chromosomech.(11)

Zápis normálního karyotypu vypadá následovně:

46, XX (Žena)

46,XY (Muž)

V patologickém karyotypu lze rozlišit jak numerické, tak i strukturní aberace, z nichž každý typ má svá specifická pravidla pro zápis. Při zápisu abnormalit se za celkový počet chromosomů nejprve uvádějí změny pohlavních chromosomů, počínaje změnami na chromosomu X. Následují aberace autozomů ve vzestupném číselném pořadí, přičemž se ke konkrétnímu chromosomu nejprve uvedou numerické abnormality a poté strukturní abnormality v abecedním pořadí dle zkratk aberací.(11)

7.2.1 Zápis numerických aberací

V případě, že se v karyotypu nachází nadbytečné chromosomy, nebo je zde naopak nižší počet chromosomů, používají se v zápisu znaménka plus (+) a mínus (-).

7.2.2 Zápis strukturních aberací

Strukturní změny na chromosomech se značí písemnou zkratkou daného jevu. V karyotypu vyšetřovaného souboru pacientů se nejčastěji nacházejí zkratky uvedené níže.

add - nadbytečný chromosomový materiál s neznámým původem

del - delece

der - derivovaný chromosom

dic - dicentrický chromosom

dn - nově vzniklá chromosomová abnormalita

dup - duplikace chromosomového segmentu

inc - nekompletní karyotyp

ins - inzerce

inv - inverze

mar - marker chromosom

pter - terminální segment krátkého raménka

qter - terminální segment dlouhého raménka

t - translokace

Při zápisu aberací v rámci dvou zlomů na jediném chromosomu se v závorce uvádějí nejprve změny na krátkém raménku (p-), poté změny na dlouhém raménku (q-). Pokud dojde k oběma zlomům na jednom raménku chromosomu, jako první se uvádí lokace zlomu bližšího k centromere. (11)

7.2.3 Zápis nádorových klonů buněk

Dělením jedné buňky může vzniknout buněčná populace zvaná buněčný klon. Aby bylo možné považovat buněčnou populaci za klon, musí obsahovat nejméně dvě buňky se stejnou mutací. Nicméně pokud je shodnou mutací buněk ztráta chromosomového materiálu, musí tento klon obsahovat nejméně tři buňky. Z daného klonu se během nádorového bujení mohou vyvinout další subklony buněk.

V onkocytogenetice se jednotlivé karyotypy klonů nádorových buněk zapisují v konkrétním pořadí. Jako první je uvedený karyotyp základní nádorové linie buněk, tzv. stemline (sl). Za tímto údajem následují karyotypy dalších subklonů, zvané sidelines (sdl), seřazené dle složitosti a množství aberací. Pokud je přítomen i normální diploidní klon buněk bez aberace, je uveden jako poslední. Zkratky „sl“ a „sdl“ se v karyotypu používají ke zjednodušení a zkrácení zápisu subklonů. Dále je možné používat zkratku „idem“, která má v zápisu podobný význam a odkazuje na karyotyp ve stemline. (11)

Odlišné klony buněk jsou odděleny lomítkem (/). Počet buněk v každém klonu je ohraničen hranatou závorkou []. Po transplantaci buněk kostní dřeně lze u příjemců transplantátu nalézt karyotyp buněčné subpopulace od dárce. V tomto případě se v zápisu nejprve uvádí karyotyp vyšetřovaného příjemce, poté karyotyp dárce. Oba údaje jsou odděleny dvojitým lomítkem (/). (11)

7.3 Vyhodnocení vybraných karyotypů

Dle kritérií ISCN 2013 bylo interpretováno šest vybraných karyotypů pacientů s chronickou lymfocytární leukemií ze sestavovaného souboru (soubor viz tabulka č. 4).

Pacient č. 2 :

46,XX,add(3)(p21),del(13)(q13q33)[3]/46,idem,del(11)(q13q23)[13]/46,XX[1]

Jedná se o zápis nádorového karyotypu, kdy byla nalezena jedna mitóza s normálním ženským karyotypem a 16 patologických mitóz. V patologických mitózách lze rozlišit dva klony. V hlavní linii nádorových buněk, která čítala tři mitózy, je karyotyp se 46 chromosomy a neznámým nadbytečným materiálem na chromosomu 3, konkrétně na jeho p raménku, od pruhu p21 k telomeře chromosomu. Dále je v tomto klonu přítomna delecce materiálu na chromosomu 13, na q raménku, mezi pruhy q13 a q33. Ve vedlejší linii, která byla pozorována ve 13 mitózách, je navíc oproti hlavní linii přítomna delecce materiálu na chromosomu 11, na q raménku, mezi pruhy q13 a q23.

Pacient č. 11

46,XX,del(11)(q21q23)[4]/45,XX,add(1)(q41),del(11)(q21q23),-14,
der(18)t(14;18)(q11;p11)[10]/46,XX[3]

V tomto nádorovém karyotypu byly nalezeny tři mitózy s normálním ženským karyotypem a 14 mitóz s patologickým karyotypem ve dvou liniích. V hlavní nádorové linii buněk se 46 chromosomy v získané ze čtyř mitóz, se nachází delecce chromosomu 11, na jeho q raménku mezi pruhy q21 a q23. Ve vedlejší linii se 45 chromosomy jsou zahrnuty změny z hlavní linie a kromě toho je zde přítomen nadbytečný chromosomový materiál na chromosomu 1, na jeho q raménku od pruhu q41 až k telomeře. Navíc zde došlo k nebalancované translokaci mezi chromosomem 18, segment od pruhu q11 k telomeře, a chromosomem 14, od pruhu p11 k telomeře. Dále došlo ke ztrátě takto pozměněného chromosomu 14.

Pacient č. 63

46,XY,del(11)(q22q23)[5]/46,X,-Y,del(11)(q22q23),+mar[8]/46,XY[3]

V nádorovém karyotypu tohoto pacienta byly nalezeny tři mitózy s normálním mužským karyotypem a 13 mitóz s patologickým karyotypem. V patologických mitózách se nacházejí dva klony buněk. V hlavní nádorové linii buněk se 46 chromosomy, bylo

nalezeno pět mitóz s delecí na 11 chromosomu, na raménku q, mezi pruhy q22 a q23. Tyto změny byly nalezeny také ve vedlejší nádorové linii, čítající celkem osm mitóz. Navíc byla v této linii zjištěna ztráta chromosomu Y a přítomnost jednoho neidentifikovatelného (marker) chromosomu.

Pacient č. 85

46,XY,del(11)(q21q23)[1]/46,sl,der(1)(?),der(13)?ins(13;1)(?)[6]/
46,sd11,del(6)(q13q21)[17]

V tomto případě se jedná o zápis nádorového karyotypu, kdy bylo nalezeno 24 mitóz s patologickým karyotypem. V hlavní nádorové linii se 46 chromosomy je přítomna delece na chromosomu 11, na q raménku, mezi pruhy q21 a q23. Ve vedlejší nádorové linii, se 46 chromosomy, pozorované v šesti mitózách, jsou přítomny změny z hlavní linie a navíc se zde vyskytují derivované chromosomy 1 a 13. Do chromosomu 13 byl vložen segment z chromosomu 1, přičemž nebylo možné identifikovat přesné rozhraní zlomů na chromosomech. Ve druhé vedlejší linii, se 46 chromosomy, pozorované v 17 mitózách, jsou přítomny změny z první vedlejší linie a navíc se zde objevila delece na chromosomu 6, na raménku q, v úseku mezi pruhy q13 a q21.

Pacient č. 121

46,XX,del(14)(q24q32)[3]/45,idem,-9,der(17)t(9;17)(q12;p11.2)[5]/
47,idem,+12[3]/46,idem,del(3)(p14)[2]/46,idem,del(17)(p11.2)[2]/46,XX[4]

Tento zápis nádorového karyotypu se skládá z čtyř mitóz s normálním ženským karyotypem a 15 mitóz s patologickým karyotypem. Patologické karyotypy se nachází v pěti klonech. V hlavní nádorové linii se 46 chromosomy, je ve třech mitózách přítomna delece na chromosomu 14, na raménku q, lokalizována mezi pruhy q24 a q32. V první vedlejší nádorové linii se 45 chromosomy, zachycené v pěti mitózách, jsou změny stejné jako v hlavní linii. Dále v této linii došlo k nebalancované translokaci segmentu mezi chromosomem 17, od pruhu q12 k telomeře, a chromosomem 9, od pruhu p11 (pravděpodobně p11.2) k telomeře, derivovaný chromosom 9 byl poté ztracen. Ve druhé vedlejší linii pozorované ve třech mitózách, je 47 chromosomů, neboť je zde nadbytečná kopie chromosomu 12. Ve třetí vedlejší nádorové linii se 46 chromosomy, pozorované ve třech mitózách, jsou opět přítomné změny z hlavní linie. K těmto aberacím je navíc přidružená delece na chromosomu 3, na p raménku, od pruhu p1 (pravděpodobně p14) k telomeře. Čtvrtá vedlejší nádorová linie se 46 chromosomy byla pozorována ve dvou

mitózách. Oproti hlavní linii byl tento klon rozšířen o delecí na chromosomu 17, od pruhu p11 (pravděpodobně p11.2) k telomeře.

Pacient č. 134:

46,XY,del(11)(q21q23)[9]/46,idem,+2,dic(2;18)(q11;p11)[5]/46,XY[6]

V tomto zápise se nachází šest mitóz s normálním mužským karyotypem a 14 mitóz s patologickým karyotypem. V hlavní nádorové linii se 46 chromosomy, která byla pozorována v devíti mitózách, se nachází delecí na chromosomu 11, na q raménku, mezi pruhy q21 a q23. Ve vedlejší linii se 46 chromosomy, která byla pozorována v pěti mitózách, jsou přítomné změny z hlavní linie a navíc je zde nadbytečný chromosom 2. V tomto klonu byl dále nalezen dicentrický chromosom, vzniklý fúzí chromosomů 2 a 18, přičemž z chromosomu 2 chybí úsek od pruhu q11 po telomeru q raménka a z chromosomu 18 chybí úsek od pruhu p11 po telomeru p raménka. Chromosomy se spojily úseky obsahujícími centromeru, a tím došlo ke vzniku dicentrického chromosomu.

8 ZKOUMANÝ VZOREK PACIENTŮ

Z anonymních lékařských zpráv jsme dle stanovených kritérií vybírali požadovaná data o pacientech s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a následně jsme sestavili níže uvedené tabulky. Viz tabulka č. 3 a tabulka č. 4.

Data o pacientech jsou rozdělena do dvou hlavních částí. V první části (viz tabulka č. 3) jsou zaznamenány základní údaje o pacientovi a jeho případné léčbě CLL. Je zde uvedeno pohlaví pacienta, věk při záchytu CLL a s tím související datum záchytu onemocnění. V dalších sloupcích jsou zapsány informace o tom, zda byl pacient v minulosti léčen pro jinou onkologickou malignitu. Následně je blíže specifikován rok, ve kterém byl pacient pro tuto malignitu léčen a jaký typ léčby byl použit. V tabulce je dále uvedeno stádium CLL (stupňováno dle Raie) při záchytu. Pokud byla zahájena léčba CLL, do tabulky je zapsán datum začátku léčby a doba (v měsících), která uběhla od záchytu onemocnění po samotné zahájení léčby. Do tabulky je zaznamenán typ chemoterapeutik užívaný při první linii léčby CLL a hodnotí se úspěšnost této fáze léčby, vyjádřená parciální či kompletní remisí tohoto onemocnění. Závěrem je v tabulce uvedeno, zda pacient žije, či nikoliv a také datum, ke kterému se tato informace vztahuje. V případě, že pacient již nežije, uvádí se datum úmrtí. Doba sledování určuje u žijících pacientů dobu (v měsících), která uplynula od data záchytu onemocnění po současnost. Doba přežití určuje u nežijících pacientů dobu (v měsících), která uplynula od data záchytu onemocnění po datum úmrtí. Na závěr je v tabulce uvedena příčina úmrtí pacienta.

Druhá část dat obsahuje informace o cytogenetickém a molekulárně-cytogenetickém vyšetření karyotypu pacientů (viz tabulka č. 4). Karyotyp pacientů byl hodnocen pomocí metody G – pruhování a pomocí metody FISH (fluorescenční in situ hybridizace) byly analyzovány cytogenetické změny s použitím sond pro geny *ATM* (11q22-23), *TP53* (17p13.1), *MYB* (6q21), *SEC63* (6q23), *LAMP1* (13q34) a pro lokusy D13S319 (lokalizace genu 13q14) a D12Z3 (sonda pro zachycení centromery chromosomu 12). Pro každý gen je uveden počet kopií, které byly sondou zachyceny a případně počet patologických buněk uvedený v procentech.

Tabulka 3: Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

	Pohlaví (Muž/ Žena)	Věk při záchytu (roky)	Datum záchytu	Léčba pro jinou malig. (Ano/ Ne)	Rok a typ léčby pro jinou malignitu	Stádium nemoci dle Raie (při záchytu)	Datum zahájení léčby	Doba od záchytu po začátek léčby (měsíce)	Typ léčby I.linie	Úspěšnost léčby	Současnost (Žije/ Nežije)	Současnost k datu/datum úmrť	Doba sledová- ní (měsíce)	Doba přežití od záchytu (měsíce)	Příčina úmrť (CLL/ jiná)
1	M	62	1.5.2008	N		1	1.3.2009	10	R-FC	CR	Ž	23.3.2015	82		
2	Ž	69	1.4.2008	N		2	1.6.2008	2	R-CHOP, solorituximab	PR	Ž	23.3.2015	83		
3	M	70	1.5.2008	N		1	1.6.2009	13	R-CHOP	PR	N	7.3.2013		58	CLL
4	M	59	1.6.2008	N		1	1.4.2009	10	R-FC, solorituximab	PR	Ž	24.3.2015	81		
5	M	70	1.5.2008	N		0			bez léčby		N	1.12.2011		43	jiná
6	M	64	1.7.2008	N		3	1.11.2008	2	R-FC	PR	N	1.8.2010		25	CLL
7	M	55	1.7.2008	N		1			bez léčby		Ž	24.3.2015	80		
8	M	61	1.7.2008	N		0			bez léčby		Ž	24.3.2015	80		
9	M	56	1.7.2008	N		1			bez léčby		Ž	24.3.2015	80		
10	Ž	50	1.9.2008	N		0			bez léčby		Ž	24.3.2015	78		
11	Ž	71	1.9.2008	N		1	1.12.2009	15	R-FC	CR	Ž	24.3.2015	78		
12	Ž	77	1.3.2007	N		0	1.10.2008	19	Prednison, Leukeran	PR	Ž	24.3.2015	96		
13	Ž	61	1.3.2007	N		0	1.7.2010	40	R-FC, solorituximab	PR	N	1.7.2011		52	CLL
14	M	66	1.11.2008	N		2	1.2.2009	3	R-CHOP, solorituximab	CR	Ž	24.3.2015	76		
15	M	61	1.11.2008	N		0	1.3.2012	40	R-FC	CR	Ž	24.3.2015	76		
16	M	70	1.9.2008	N		1	1.12.2008	3	R-CHOP, solorituximab	CR	Ž	24.3.2015	78		
17	Ž	61	1.1.2009	N		0			bez léčby		Ž	24.3.2015	74		
18	Ž	78	1.1.2009	N		0	1.2.2012	37	Leukeran, COP	PR	N	24.3.2015		74	CLL
19	M	67	1.6.2008	N		0	1.1.2012	43	R-CHOP	CR	N	1.9.2014		75	CLL
20	M	48	1.12.2008	N		0			bez léčby		Ž	25.3.2015	75		
21	Ž	78	1.11.2008	N		0			bez léčby		Ž	25.3.2015	76		
22	M	52	1.4.2009	N		2	1.2.2010	10	R-FC, solorituximab	CR	Ž	25.3.2015	71		

Tabulka 3 (pokračování): Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Pohlaví (Muž/Žena)	Věk při záchytu (roky)	Datum záchytu	Léčba pro jinou malig. (Ano/Ne)	Rok a typ léčby pro jinou malignitu	Stádium nemoci dle Raie (při záchytu)	Datum zahájení léčby	Doba od záchytu po začátek léčby (měsíce)	Typ léčby I.linie	Úspěšnost léčby	Současnost (Žije/Nežije)	Současnost k datu/datum úmrtí	Doba sledová-ní (měsíce)	Doba přežití od záchytu (měsíce)	Příčina úmrtí (CLL/jiná)
23	Ž	64	1.3.2009	N		0	1.5.2010	14	R-FC, solorituximab	PR	Ž	25.3.2015	72		
24	Ž	74	1.4.2009	A	1984, AT, karcinom dělohy	1	1.8.2009	4	Leukeran, Fludara	PR	N	1.3.2013		47	CLL
25	Ž	71	1.4.2009	A	1985, AT, karcinom prsu	3	1.5.2009	1	R-CHOP	CR	N	1.9.2013		53	CLL
26	M	56	1.5.2009	N		1	22.8.2013	51	R-FC	CR	Ž	31.3.2015	70		
27	M	63	1.5.2009	N		1	1.4.2010	11	Leukeran, R-FC, solorituximab	CR	Ž	31.3.2015	70		
28	M	62	1.6.2009	N		0			bez léčby		Ž	31.3.2015	69		
29	M	61	1.10.2009	N		2	1.11.2010	13	R-CHOP	CR	Ž	31.3.2015	65		
30	Ž	61	1.11.2009	N		1			bez léčby		Ž	31.3.2015	64		
31	M	57	1.7.2009	N		3	1.9.2009	2	R-CHOP	CR	Ž	31.3.2015	68		
32	Ž	64	1.1.2007	N		2	1.10.2010	45	R-FC, solorituximab	CR	Ž	31.3.2015	98		
33	M	48	1.9.2009	N		0			bez léčby		Ž	31.3.2015	66		
34	M	64	1.8.2009	N		4			bez léčby		N	21.9.2009		1	CLL
35	M	61	1.9.2009	N		2	25.11.2009	2	R-FC	PR	N	28.12.2009		3	CLL
36	M	56	1.10.2009	N		4	14.10.2009	1	R-CHOP, solorituximab	CR	Ž	31.3.2015	65		
37	Ž	51	1.10.2009	A	Chemoterapeutické režimy pro Hodgkinův lymfom	4	1.12.2009	2	R-COP, solorituximab (léčba Hodgkinova lymfomu)	CR	Ž	31.3.2015	65		
38	M	65	1.10.2009	N		0	1.6.2011	20	R-FC	PR	Ž	31.3.2015	65		
39	M	65	1.5.2009	N		4	1.7.2009	2	R-FC, solorituximab	PR	N	1.11.2009		6	CLL

Tabulka 3 (pokračování): Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Pohlaví (Muž/Žena)	Věk při záchytu (roky)	Datum záchytu	Léčba pro jinou malig. (Ano/Ne)	Rok a typ léčby pro jinou malignitu	Stádium nemoci dle Raie (při záchytu)	Datum zahájení léčby	Doba od záchytu po začátek léčby (měsíce)	Typ léčby I.linie	Úspěšnost léčby	Současnost (Žije/Nežije)	Současnost k datu/datum úmrtí	Doba sledová-ní (měsíce)	Doba přežití od záchytu (měsíce)	Příčina úmrtí (CLL/ jiná)
40	M	79	1.1.2008	N		1			bez léčby		Ž	31.3.2015	86		
41	M	67	1.1.2007	N		1	1.7.2009	30	chlorambucil, R-FC	CR	Ž	31.3.2015	98		
42	M	55	1.12.2009	N		0	1.6.2013	42	R-FC	CR	Ž	31.3.2015	63		
43	M	69	1.12.2009	N		0	2.1.2015	61	R-FC, solorituximab		Ž	2.4.2015	64		
44	M	61	1.1.2010	N		0	1.9.2011	20	R-FC	CR	Ž	2.4.2015	63		
45	M	33	1.1.2010	N		1	1.9.2010	8	R-FC, solorituximab	PR	Ž	2.4.2015	63		
46	Ž	68	1.1.2008	N		1	1.3.2010	26	R-COP, solorituximab	CR	Ž	2.4.2015	87		
47	M	62	1.1.2010	N		2	1.3.2010	2	R-FC, solorituximab	CR	Ž	2.4.2015	65		
48	Ž	70	1.4.2010	N		1	17.8.2011	16	R-FC, solorituximab	CR	Ž	2.4.2015	60		
49	Ž	50	1.4.2010	N		1	22.7.2014	51	R-FC	CR	Ž	2.4.2015	60		
50	Ž	61	1.1.2010	N		1	1.4.2010	3	FAMP, R-CHOP	CR	N	1.2.2014		49	CLL
51	M	61	1.5.2010	N		1	1.1.2011	6	R-COP	PR	N	14.12.2013		43	CLL
52	M	58	1.5.2010	N		3	1.5.2010	1	R-CHOP	PR	Ž	3.4.2015	59		
53	M	46	1.6.2010	N		2	1.6.2010	1	R-FC	CR	Ž	23.4.2015	58		
54	M	73	1.6.2010	N		4	1.6.2010	1	R-FC	PR	N	1.12.2013		43	CLL
55	Ž	62	1.6.2010	N		0			bez léčby		Ž	23.4.2015	58		
56	M	65	1.6.2010	N		2	1.8.2010	2	R-FC	CR	Ž	23.4.2015	58		
57	M	56	1.6.2010	N		0	1.7.2014	49	R-FC	CR	Ž	23.4.2015	58		
58	Ž	56	1.3.2010	N		2	1.7.2010	4	R-FC, solorituximab	PR	Ž	23.4.2015	61		
59	M	61	1.1.2005	N		1	1.3.2010	62	Leukeran, Prednison	CR	N	1.6.2013		101	jiná
60	M	69	1.8.2010	N		4			bez léčby		Ž	23.4.2015	56		

Tabulka 3 (pokračování): Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Pohlaví (Muž/Žena)	Věk při záchytu (roky)	Datum záchytu	Léčba pro jinou malign. (Ano/Ne)	Rok a typ léčby pro jinou malignitu	Stádium nemoci dle Raie (při záchytu)	Datum zahájení léčby	Doba od záchytu po začátek léčby (měsíce)	Typ léčby I.linie	Úspěšnost léčby	Současnost (Žije/Nežije)	Současnost k datu/datum úmrtí	Doba sledová-ní (měsíce)	Doba přežití od záchytu (měsíce)	Příčina úmrtí (CLL/ jiná)
61	M	63	1.5.2010	N		1	1.9.2012	28	FC, R-FC	CR	Ž	23.4.2015	59		
62	Ž	58	1.9.2010	N		2	1.3.2011	6	soloalemtuzumab	CR	Ž	23.4.2015	55		
63	M	59	1.10.2010	N		4	1.10.2010	1	R-CHOP, R-FC	CR	Ž	23.4.2015	54		
64	M	64	1.9.2010	N		0	14.10.2014	49	Levact, idealisib/placebo	CR	Ž	23.4.2015	55		
65	M	66	1.10.2010	N		1	1.11.2013	37	R-FC	CR	Ž	3.5.2015	55		
66	Ž	66	1.9.2010	N		0	1.1.2015	52	R-FC	PR	Ž	3.5.2015	56		
67	M	69	1.11.2010	N		3	1.11.2010	1	R-CHOP, solorituximab	CR	Ž	3.5.2015	54		
68	Ž	59	1.10.2010	N		0	1.10.2011	12	R-FC	PR	Ž	3.5.2015	55		
69	M	60	1.11.2010	N		1	1.12.2010	1	R-CHOP	CR	Ž	3.5.2015	54		
70	M	58	1.11.2010	N		3	1.11.2010	1	R-CHOP	CR	Ž	3.5.2015	54		
71	Ž	59	1.11.2010	N		3	1.12.2010	1	R-FC, solorituximab	CR	Ž	3.5.2015	54		
72	Ž	66	1.11.2010	A	2008, CHT FEC+Cardioxan, karcinom prsu	3	1.12.2010	1	R-COP	CR	Ž	3.5.2015	54		
73	M	67	1.1.2011	N		3	1.2.2011	1	R-FC	PR	N	1.8.2014		43	CLL
74	M	68	1.1.2011	N		2	1.2.2011	1	R-FC	CR	Ž	3.5.2015	52		
75	Ž	62	1.1.2011	N		0	1.4.2013	27	R-FC	CR	Ž	3.5.2015	52		
76	M	60	1.1.2008	N		0			bez léčby		Ž	3.5.2015	88		
77	Ž	47	1.4.2011	N		0			bez léčby		Ž	3.5.2015	49		
78	M	66	1.6.2011	N		3	1.6.2011	1	R-FC	CR	N	1.8.2014		38	CLL
79	M	59	1.6.2011	N		0			bez léčby		Ž	20.5.2015	47		

Tabulka 3 (pokračování): Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Pohlaví (Muž/Žena)	Věk při záchytu (roky)	Datum záchytu	Léčba pro jinou malig. (Ano/Ne)	Rok a typ léčby pro jinou malignitu	Stádium nemoci dle Raie (při záchytu)	Datum zahájení léčby	Doba od záchytu po začátek léčby (měsíce)	Typ léčby I.linie	Úspěšnost léčby	Současnost (Žije/Nežije)	Současnost k datu/datum úmrtí	Doba sledová-ní (měsíce)	Doba přežití od záchytu (měsíce)	Příčina úmrtí (CLL/ jiná)
80	M	60	1.6.2011	N		1			bez léčby		Ž	20.5.2015	47		
81	Ž	62	1.5.2011	N		1	1.10.2011	5	R-FC	CR	Ž	20.5.2015	48		
82	Ž	66	1.4.2011	N		1	1.6.2011	2	R-FC, solorituximab	PR	N	1.12.2012		20	CLL
83	Ž	77	1.6.2011	N		1	1.11.2011	5	R-FC	CR	Ž	20.5.2015	47		
84	Ž	55	1.7.2011	N		1			bez léčby		Ž	20.5.2015	46		
85	M	67	1.3.2011	N		2	1.7.2011	4	R-FC	CR	N	1.5.2015		50	CLL
86	M	51	1.7.2011	N		0	1.8.2012	13	R-FC	CR	Ž	20.5.2015	46		
87	M	60	1.7.2011	N		1	1.8.2012	13	R-FC	PR	N	1.5.2014		34	CLL
88	M	49	1.3.2011	N		0	1.12.2013	33	R-FC	CR	Ž	20.5.2015	50		
89	M	60	1.3.2011	N		1	1.7.2011	4	R-FC, solorituximab	CR	N	1.1.2014		34	CLL
90	M	54	1.8.2011	N		3	1.9.2011	1	solorituximab	PR	N	1.4.2013		20	CLL
91	M	65	1.9.2011	N		3	1.9.2011	1	R-FC	CR	N	1.12.2014		39	CLL
92	M	72	1.6.2011	N		3	1.2.2014	32	R-FC, solorituximab	CR	Ž	20.5.2015	47		
93	M	51	1.9.2011	N		2	1.9.2011	1	R-FC	PR	Ž	20.5.2015	50		
94	M	65	1.8.2011	N		1			bez léčby		Ž	3.6.2015	46		
95	Ž	48	1.10.2011	N		1			bez léčby		Ž	3.6.2015	44		
96	M	73	1.5.2011	N		2	1.12.2011	7	R-FC	CR	Ž	3.6.2015	49		
97	M	66	1.10.2011	N		2	1.10.2012	12	R-CHOP	CR	Ž	3.6.2015	44		
98	M	57	1.12.2011	N		1	1.9.2013	21	R-CHOP	CR	Ž	3.6.2015	42		

Tabulka 3 (pokračování): Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Pohlaví (Muž/Žena)	Věk při záchytu (roky)	Datum záchytu	Léčba pro jinou malig. (Ano/Ne)	Rok a typ léčby pro jinou malignitu	Stádium nemoci dle Raie (při záchytu)	Datum zahájení léčby	Doba od záchytu po začátek léčby (měsíce)	Typ léčby I.linie	Úspěšnost léčby	Současnost (Žije/Nežije)	Současnost k datu/datum úmrtí	Doba sledová-ní (měsíce)	Doba přežití od záchytu (měsíce)	Příčina úmrtí (CLL/ jiná)
99	Ž	61	1.12.2011	A	2004, radioterapie, hormonální terapie pro karcinom prsu	1			bez léčby		Ž	3.6.2015	42		
100	Ž	56	1.1.2012	N		0			bez léčby		Ž	3.6.2015	41		
103	M	53	1.3.2012	N		1			bez léčby		Ž	10.6.2015	39		
104	Ž	57	1.2.2012	N		1			bez léčby		Ž	10.6.2015	40		
105	M	70	1.3.2012	N		1	1.12.2013	21	R-COP	CR	Ž	10.6.2015	39		
106	Ž	68	1.10.2012	N		1	1.12.2012	2	R-FC	CR	Ž	10.6.2015	32		
107	M	61	1.3.2012	N		3	1.3.2012	1	R-FC, solorituximab	CR	N	1.4.2015		37	CLL
108	M	78	1.12.2011	N		3	1.5.2012	5	chlorambucil, cyclofosamid	PR	Ž	10.6.2015	42		
109	Ž	71	1.4.2012	N		1	1.8.2012	4	R-FC	CR	Ž	10.6.2015	38		
110	Ž	74	1.4.2012	N		1	1.6.2012	2	R-COP	PR	Ž	10.6.2015	38		
111	M	68	1.5.2012	N		4	1.6.2012	1	R-FC, solorituximab	CR	Ž	10.6.2015	37		
112	M	59	1.6.2012	N		0			bez léčby		Ž	10.6.2015	36		
113	M	73	1.4.2012	N		1			bez léčby		Ž	10.6.2015	38		
114	M	74	1.6.2012	N		1			bez léčby		Ž	10.6.2015	36		
115	M	69	1.8.2012	N		0	21.11.2013	15	chlorambucil	CR	Ž	23.6.2015	34		
116	M	70	1.8.2012	N		2	1.10.2014	26	R-COP	CR	Ž	23.6.2015	34		
117	M	64	1.8.2012	N		1	7.2.2013	6	R-FC	CR	Ž	23.6.2015	34		
118	M	37	1.8.2012	N		3	1.9.2012	1	R-FC	CR	N	1.2.2014		18	CLL
119	M	62	1.9.2012	N		1	20.11.2014	26	R-FC, solorituximab	CR	Ž	23.6.2015	33		

Tabulka 3 (pokračování): Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Pohlaví (Muž/Žena)	Věk při záchytu (roky)	Datum záchytu	Léčba pro jinou malign. (Ano/Ne)	Rok a typ léčby pro jinou malignitu	Stádium nemoci dle Raije (při záchytu)	Datum zahájení léčby	Doba od záchytu po začátek léčby (měsíce)	Typ léčby I.linie	Úspěšnost léčby	Současnost (Žije/Nežije)	Současnost k datu/datum úmrtí	Doba sledová-ní (měsíce)	Doba přežití od záchytu (měsíce)	Příčina úmrtí (CLL/jiná)
120	M	67	1.9.2012	N		1			bez léčby		Ž	23.6.2015	33		
121	Ž	76	1.8.2012	N		1	1.2.2013	6	R-COP	PR	Ž	23.6.2015	34		
122	M	71	1.10.2012	N		1	1.9.2013	11	R-FC	CR	Ž	23.6.2015	32		
126	Ž	68	1.11.2012	A	1999, radioterapie, hormonální terapie pro karcinom prsu	0			bez léčby		Ž	23.6.2015	31		
127	M	64	1.12.2012	N		1			bez léčby		Ž	23.6.2015	30		
128	M	75	1.1.2013	N		0			bez léčby		Ž	23.6.2015	29		
129	Ž	62	1.1.2013	N		0			bez léčby		Ž	25.6.2015	29		
130	Ž	56	1.1.2013	N		0			bez léčby		Ž	25.6.2015	29		
131	M	62	1.1.2013	N		0			bez léčby		Ž	25.6.2015	29		
132	Ž	67	1.1.2013	N		1	21.10.2014	21	solorituximab, Levact, idealisib/placebo	PR	Ž	25.6.2015	29		
133	M	60	1.1.2013	N		4	1.1.2013	1	R-FC	CR	Ž	25.6.2015	29		
134	M	74	1.2.2013	N		2	1.2.2013	1	R-CHOP, R-COP	CR	Ž	25.6.2015	28		
135	Ž	57	1.2.2013	N		0			bez léčby		Ž	25.6.2015	28		
136	M	39	1.2.2013	N		1	1.11.2014	21	R-FC	CR	Ž	25.6.2015	28		
137	M	62	1.11.2012	N		1			bez léčby		Ž	25.6.2015	31		
138	M	72	1.3.2013	N		1	1.4.2013	1	R-FC	CR	N	25.6.2015		27	CLL
139	M	40	1.5.2013	N		1			bez léčby		Ž	25.6.2015	25		
140	Ž	50	1.4.2013	N		1			bez léčby		Ž	25.6.2015	26		

Tabulka 3 (pokračování): Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Pohlaví (Muž/Žena)	Věk při záchytu (roky)	Datum záchytu	Léčba pro jinou malig. (Ano/Ne)	Rok a typ léčby pro jinou malignitu	Stádium nemoci dle Raie (při záchytu)	Datum zahájení léčby	Doba od záchytu po začátek léčby (měsíce)	Typ léčby I.linie	Úspěšnost léčby	Současnost (Žije/Nežije)	Současnost k datu/datum úmrtí	Doba sledování (měsíce)	Doba přežití od záchytu (měsíce)	Příčina úmrtí (CLL/jiná)
141	M	62	1.4.2013	N		1	1.9.2014	17	solorituximab, Levact, idealisib/placebo	CR	Ž	25.6.2015	26		
143	Ž	64	1.6.2013	N		0			bez léčby		Ž	25.6.2015	24		
144	M	57	1.7.2013	N		1			bez léčby		Ž	25.6.2015	23		
145	M	66	1.7.2013	N		1	1.6.2014	11	R-FC	CR	Ž	25.6.2015	23		
146	M	48	1.7.2013	N		1			bez léčby		Ž	25.6.2015	23		

Legenda pro tabulku 3: M - muž, Ž - žena, A - ano, N (5.sloupec)- ne, AT-aktinoterapie, CHT-chemoterapie, CR - kompletní remise, PR - parciální remise, N - nežije, Ž (12. sloupec) - žije

Tabulka 4: Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo- gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S31 9 (%p.b)	D13S3 19 2. klon (p.k)	D13S3 19 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
1	46,XY,del(13)(q13q14)[6] 46,XY[10]	2		2		2		1	60			2		2			
2	46,XX,add(3)(p21),del(13)(q13q33)[3] 46,idem,del(11)(q13q23)[13] 46,XX[1]	1	50	2		2		0	85	1	5	2		2			
3	45,XY,del(8)(p?21),der(17;18)(q10;q10)[4] 46,XY[11]	2		1	44	2		2				2		2			
4	46,XY,add(11)(q21)[10] 46,XY,t(2;?7)(p11;p11),add(11)(q21)[9] 46,XY[8]	1	66	2		2		1	21			2		2			
5	46,XY[15]	2		2		2		2				2		2			
6	46,XY,t(14;19)(q32;q13)[1] 46,XY,t(14;19)(q32;q13),add(18)(p11)[14]	2		2		2		2				2		2			
7	46,XY[15]	2		2		2		2				2		2			
8	46,XY,del(13)(q13q14)[3] 46,XY[12]	2		2		2		0	60			2		2			
9	46,XY,del(13)(q14q21)[2] 46,XY[13]	2		2		2		1	60			2		2			
10	46,XX[20]	2		2		2		0	50			2		2			
11	46,XX,del(11)(q21q23)[4] 45,XX,add(1)(q41),del(11)(q21q23),- 14,der(18)t(14;18)(q11;p11)[10] 46,XX[3]	1	90	2				1	85			2		2		2	
12	46,XX[15]	2		2				1	24			2		2		2	
13	46,XX[20]	2		2				2				2		2			
14	46,XY[15]	2		2				1	70			2		2			

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo-- gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S31 9 (%p.b)	D13S3 19 2. klon (p.k)	D13S3 19 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
15	46,XY[15]	2		2				1	15			2		2			
16	47,XY,+12,der(14)inv(14)(p11q32)del(14) (q12-21q31)[15] 46,XY[1]	2		2				2				2		3	76		
17	46,X,-X,t(2;12)(q24;p13),+12[16]	2		2				2				2		3	50		
18	46,XX,add(5)(pter)[14] 46,XX[1]	2		2				2				2		2			
19	47,XY,+12[7] 46,XY[13]	2		2				2				2		3	25		
20	46,XY[15]	2		2				1	65			2		2			
21	46,XX,t(7;13)(p15;q14)[8] 46,XX[12]	2		2										2			
22	46,XY[17]	2		2				1	44	0	8	2		2		2	
23	46,XX,del(13)(q13q22)[14] 46,XX[1]	2		2				1	46	0	24	2		2			
24	46,XX,del(11)(q21)[19] 46,XX[1]	1	90	2				2				2		2			
25	46,XX,del(11)(q21q23),t(11;14;12)(q13;q31;q24) [9] 46,idem,add(16)(q24)[11] 46,XX[1]	1	80	2				2				2		2			
26	46,XY,del(13)(q13q21)[7] 46,XY[10]	2						1	15			2		2			
27	46,XY,del(11)(q13q23),del(13)(q13q21)[13] 46,idem,der(17)t(2;17)(p13;q25)[10] 46,XY[1]	1	73	2				1	75			2		2			

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo- gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S319 (%p.b)	D13S319 2. klon (p.k)	D13S319 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
28	46,XY,t(2;18)(p12;q22)[14]46,XY[1]	2		2				1	45			2		2			
29	46,XY[20]	2		2				1	79			2		2			
30	46,XX[20]	2		2				1	75			2		2			
31	46,XY[20]	2		2				2				2		2			
32	46,XX,del(11)(q21q22)[19]/ 46,idem,t(1;18)(p21;q23)[2]	1	99	2				1	99			2		2			
33	47,XY,+12[3]/46,XY[11]	2		2				2				2		3	7		
34	46,XY,del(6)(q14-16),del(11)(q21q24)[7]46,XY[7]	1	11	2				2				2		2		1	12
35	46,XY,add(6)(p21),der(9)t(6;9)(p21;p13)del(9) (q13q22),add(17)(p11.2),inc[1] 46,idem,-2x8,-9,-15,-18,-21,+6mar,inc[1] 46,XY[8]	2		1	65			1	76			2		2		2	
36	46,XY[15]	2		2				1	65	0	12	2		2			
37	47,XX,+12[3]46,XX[13]	2		2				2				2		3	13		
38	46,XY,del(6)(q13)[21]46,XY[1]	2		2				2				2		2			
39	37-40,XY,add(2)(p?ter),-3,-11,-12,-13,-13,-14,-17,- 19,+3-5mar[cp9]																
40	46,XY,der(10)t(10;13)(p13;q14),der(13)t(10;13) (p13;q13),+mar[cp8] 46,XY,t(7;?)(q11;?),der(10)t(10;13)(p13;q14), der(13)t(10;13)(p13;q13)[cp8]46,XY,t(2;18) (p12;q22)[cp5] 46,XY[3]	2		1	23			0	65			2		2			
41	47,XY,+12[20]	2		2				2				2		3	75		
42	46,XY,del(1)(q32q42)[13]46,XY[7]	2		2				1	15			2		2			

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo- gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S31 9 (%p.b)	D13S3 19 2. klon (p.k)	D13S3 19 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
43	46,XY[20]	2		2				2				2		2			
44	46,XY[15]	2		2				1	48			2		2			
45	47,XY,+12[1]46,XY[19]	2		2				2				2		3	15		
46	46,XX,del(13)(q14q22)[15]46,XX[6]	2		2				1	80			2		2			
47	46,XY[17]	2		2				2				2		2			
48	46,X,-X,+12[15]46,idem,del(13)(q12q14)[5]	2		2				2				2		3	38		
49	47,XX,+12[5]/46,XX[15]	2		2				2				2		3	16		
50	46,XX[15]	2		2				2				2		2			
51	47,XX,+12[10]47,XX,+12,del(13)(q13q22)[9] 46,XX[1]	2		2				2				2		3	10		
52	46,XY,del(11)(q21q23)[5]46,idem,del(15)(q21q22) [8]46,XY[2]	1	80	2				1	9			2		2			
53	46,XY[20]	2		2				1	95			2		2			
54	47,XY,+12[6]46,XY[3]	2		2				2				2		3	70		
55	46,XX,add(8)(p1?1)[5]/46,XX[10]	2		2				2				1	30	2			
56	46,XY[15]	1	10	2				0	79			2		2			
57	46,XX[19]	2		2				1	85			2		2		2	
58	46,XX[15]	2		2				1	62			2		2			
59	46,XY[15]	2		2				1	56			2		2			
60	47,XY,+12[14]/46,XY[1]	2		2				2				2		3	50		
61	46,XY,add(?) (qter)[4]/46,XY[16]	1	7	2										2		2	
62	82-86<4n>,XXXX,-X,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9,-10,-12,- 13,-13,-14,-15,-16,-17,-17,-18,-18,-20,+4- 9mar[cp20]	4	83	2				2				4	82	4	82		

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo-- gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S31 9 (%p.b)	D13S3 19 2. klon (p.k)	D13S3 19 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
63	46,XY,del(11)(q22q23)[5]/ 46,X,-Y,del(11)(q22q23),+mar[8]/46,XY[3]	1	95	2				2				2		2			
64	46,XY,del(11)(q21q24),del(13)(q13q21)[14]/ 46,XY[6]	1	79	2			1	84				2		2			
65	46,XY,del(11)(q13q23)[4]46,XY[11]	1	33	2			2					2		2			
66	46,XX[15]	2		2			2					2		2		2	
67	46,XY[20]	2		2			2					2		2			
68	47,XX,+12[8]/47,idem,del(6)(?q21q25)[3]/ 46,XX[3]	2		2			2					2		3	65	1	9
69	46,XY,del(6)(q13q25)[20]	2		2			2					2		2		1	81
70	46,XY[20]	2		2			2					2		2		2	
71	46,XX[15]	2		2			1	86				2		2			
72	46,XX,t(8;14)(q24;q32),add(20)(q11.2-13.1)[6]/ 46,XX[14]	2		2			1	5				2		2			
73	47,XY,+12[15]	2		2			2					2		3	69		
74	46,XY,del(6)(q21q25)[20]	2		2			1	76				2		2		1	75
75	46,XX[20]	2		2			1	90				2		2			
76	46,XY[15]	2		2								2		2		2	
77	48,XX,t(8;14)(q24;q32),+2mar[7]/ 48,idem,del(14)(q2?2q32)[13]	2		2			2					2		2			
78	46,XY,del(10)(q?11q21),del(11)(q22q23)[13]/ 46,XY[2]	1	68	2			1	87				2		2			
79	46,XY[15]	2		2			1	77				2		2			
80	46,XY,del(11)(q?21)[5]/46,XY[15]	1	21	2			2					2		2			
81	46,XX,del(11)(q21q25),-18,i(22)(q10),+der(?) t(18;?)(q?12;?) [5]/ 45,idem,der(14;?15)(q10;q10)[10]	1	80	2			1	82				2		2			

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo- -gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S319 (%p.b)	D13S319 2. klon (p.k)	D13S319 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
82	46,XX,del(11)(q14)[20]	1	90	2				2				2		2			
83	46,XX,t(5;9)(q34;q21)[20]	2		2				1	85			2		2			
84	46,XX[15]	2		2				1	43			2		2			
85	46,XY,del(11)(q21q23)[1]/46,sl,der(1)(?) ins(13;1)(?)[6]/ 46,sdl1,del(6)(q13q21)[17]	1	92	2				1	86			2		2		1	68
86	46,XY,del(6)(q14-16,q24)[2]/46,XY[18]	2		2				2				2		2		1	18
87	45,XY,der(3)t(3;17)(q2?7,q11.2),-17[3]/ 44,XY,der(3)t(3;6)(q2?1,q14-16),-4,der(6)t(6;17) (q14-16;q11.2),der(13)t(3;13)(q2?1;p11)t(3;17) (q2?7,q11.2),-	2		1	77			1	6			2		2			
88	46,XY,der(1)t(1;?)(q21;?),del(6)(q21),der(8)t(8;13) (p11;q21),der(13)t(1;13)(q21;q13)[13]/46,XY[6]	2		2				1	30			2		2		1	37
89	45,XY,der(6;18)(p10;q10),der(17)del(17)(p10) del(17)(q2?2)[7]/ 44,XY,der(6;18)(p10;q10),der(14;17)(q10;q10)[6]/ 46,XY[6]	2		1	82			2				2		2		1	73
90	46,XY,del(11)(q14)[4]/ 46,sl,der(12)t(12;?)(p13;?)[1]/ 45,sdl1,-6,del(6)(q21q25),der(8)t(6;8) (q13;p12)[3]/46,sl,del(6)(q13)[3]/46,sl,-	1	88	2				2				2		2		1	45
91	46,XY,del(6)(q?13q25-27)[6]/46,XY[4]	2		2				2				2		2		1	74
92	47,XY,+12[12]/46,XY[3]	2		2				2				2		3	58		
93	46,XY,-17,+mar1,+mar2[cp3]46,XY[17]DODATEK - upřesněný karyotyp dle wcp FISH:46,XY,t(14;17)(q24;q25)[3]/46,XY[17]	2		2				2				2		2		2	
94	46,XY[15]	2		2				2				2		2			
95	46,XX[15]	2		2				1	74			2		2			

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo- gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S319 (%p.b)	D13S319 2. klon (p.k)	D13S319 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
96	46,XY,der(18)t(2;18)(p11.2;p11.1)[6]/46,XY[12]	2		2				1	54			2		2			
97	46,XY,del(13)(q13q31-33)[2]/ 47,XY,+12[1]/46,XY[17]	2		2				1	13			2		2			
98	46,XY[20]	2		2				2				2		2		2	
99	47,XX,+12[13]/46,XX[2]	2		2				2				2		3	38		
100	46,XX,t(11;14)(q13;q32)[10]/ 46,XX,del(13)(q12q21)[4]/ 46,XX[6]	2		2				1	13			2		2			
101	46,XY[15]	2		2				2				2		2		2	
102	46,XY,t(8;14)(q24;q32),del(11)(q14q23)[10]/ 46,XY,del(13)(q14q31-33)[6]/46,XY[3]	1	39	2				1	60			2		2			
103	46,XY[15]	2		2				2				2		2		2	2
104	46,XX[15]	2		2				1	36			2		2			
105	46,XY,del(11)(q22q24)[3]/46,XY[12]	1	33	2				1	23			2		2			
106	46,X,del(X)(q?22-24),t(4;6)(q31;q25-27), del(11)(?q14-22q23)[4]/ 47,idem,+7[10]/46,XX[5]	1	45	2				2				2		2			2
107	46,XY,del(11)(14-22)[6]/ 46,idem,add(6)(q2?2),der(9)t(6;9)(q2?2;p2?1)[8]/ 46,idem,add(6)(q?ter)[5]/ 46,XY[4] DODATEK: upřesnění zápisu karyotypu dle dodatečných FISH	1	86	2				1	14			2		2			2
108	47,XY,+12[19]/46,XY[1]	2		2				2				2		3	70		
109	46,XX,del(6)(q?13q22)[7]/46,XX[13]	2		2				1	71			2		2		1	40
110	46,XX,der(10)t(2;10)(p12;q26)[16]/46,XX[4]	2		2				2				2		2			
111	46,XY[19]	2		2				1	2			2		2			

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo- -gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S319 (%p.b)	D13S319 2. klon (p.k)	D13S319 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
112	46,XY[16]	2		2				2				2		2			
113	46,XY[20]	2		2				1	10			2		2			
114	47,XY,+12[19]/46,XY[1]	2		2				1	68			2		3	68		
115	46,XY[20]	2		2				1	65			2		2			
116	46,XY[20]	2		2				2				2		2		2	
117	46,XY,del(13)(q13q14)[9]/46,XY[11]	2		2				1	85			2		2			
118	46,XY[20]	2		2				1	55			2		2		2	
119	46,XY[15]	1	9	2				1	77			2		2			
120	46,XY[15]	2		2				1	91			2		2			
121	46,XX,del(14)(q24q32)[3]/ 45,idem,-9,der(17)t(9;17)(q12;p11.?) [5]/ 47,idem,+12[3]/ 46,idem,del(3)(p1?4)[2]/ 46,idem,del(17)(p11.?) [2]/46,XX[4]	2		1	38			1	9			2		2			
122	46,XY[20]	2		2				1	75			2		2			
123	46,XY[15]	2		2				2				2		2		2	
124	46,XX,der(4)t(2;4)(p1?2;p15)[6]/ 46,sl,add(6)(q1?4-16)[2]/ 46,XX,del(4)(p15),add(11)(q22),der(16)t(2;16) (p1?2;p13.?) [2]/ 46,sl2,-?X,+mar[2]/46,XX[6]	1	25	2				2				2		2		1	10
125	46,XX[20]	2		2				1	73			2		2			
126	46,XX[20]	2		2				1	10			2		2		2	
127	46,XY,der(12)inv dup(p12p13)dir dup(p12p13)[4]/ 46,XY[16]	2		2				2				2		2			
128	46,XY[9]	2		2				2				2		2			

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo- gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S319 (%p.b)	D13S319 2. klon (p.k)	D13S319 2. klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
129	47,XX,+12[5]/46,XX[18]	2		2				2				2		3	25		
130	46,XX[20]	2		2				1	55			2		2			
131	46,XY[20]	2		2				0	49			2		2		2	
132	46,XX,del(11)(q21q23)[12]/46,XX[3]	1	70	2				1	2			2		2			
133	46,XY,del(13)(q14?q21),inc[2]/46,XY[23]	2		2				1	17			2		2			
134	46,XY,del(11)(q21q23)[9]/ 46,idem,+2,dic(2;18)(q11;p11)[5]/46,XY[6]	1	48	2				2				2		2			
135	47,XX,+12[8]/47,idem,del(13)(q14q22)[10]/ 46,XX[2]	2		2				2				2		3	31		
136	46,XY,del(11)(q23),?del(13)(q13q21)[11]/ 46,XY[10]	1	2	2				1	72			2		2			
137	46,XY,del(14)(q24),der(21)t(14;21)(q32;q22)[14]/ 46,XY[1]	2		2				1	57			2		2			
138	46,XY,?add(17)(p11.2)[6]/ 46,sl,del(6)(q?16q26)[4]/ 45,sdl1,-8,?der(17;21)(q10;q10),+mar[2]/ 44,sl,add(3)(p22-24),-5,-16[4]/ 46,sl,del(11)(q22q23)[3]/46,XY[2]	1	18	1	62			2				2		2		1	15
139	49,XY,+12,+18,+19[18]/46,XY[2]	2		2				1	67	1	67	2		3	12		
140	46,XX[12]	2		2				1	57			2		2			
141	46,XY,del(6)(q13q21)[4]/46,XY[15]	2		2				2				2		2		1	6
142	46,XY,der(1)t(1;10)(p22;q24),der(10)t(10;11) (q24;?p)t(1;11)(p22;?p),der(11)ins(11;1)(p11.2;?) del(11)(p?)del(11)(q14-22q23)[14]/ 47,XY,+12[4]/46,XY[2]	1	46	2				2		1	25	2		3	40		
143	47,XX,+12[2]/46,XX[18]	2		2				2				2		3	35		
144	46,XY,+12[3]/46,idem,t(14;19)(q32;q13)[11]/ 46,XY[6]	2		2				2				2		3	65		

Tabulka 4 (pokračování): Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

ID	Karyotyp	ATM (počet kopií)	ATM (% patolo-- gických buněk)	TP53 (p.k)	TP53 (%p.b)	MYB (p.k)	MYB (%p.b)	D13S319 (p.k)	D13S319 (%p.b)	D13S319 klon (p.k)	D13S319 klon (%p.b)	13q34 (LAMP 1) (p.k)	13q34 (LAMP 1) (%p.b)	D12Z3 (p.k)	D12Z3 (%p.b)	SEC63 (p.k)	SEC63 (%p.b)
145	46,XY[20]	2		2				2				2		2			
146	46,XY,t(14;18)(q32;q21)[13]/46,XY[7]	2		2				1	65			2		2			

Legenda: p. k - počet kopií genu, % p. b - procento patologických buněk, FISH-fluorescenční in situ hybridizace

9 PREZENTACE A INTERPRETACE ZÍSKANÝCH ÚDAJŮ

9.1 Vyhodnocení souboru pacientů

Anonymní data jsou nasbírána od pacientů, u kterých byla zachycena chronická lymfocytární leukémie (CLL) v období od ledna 2007 až do července 2013. Data jsou k vidění v tabulce č. 3. Hodnocený soubor má celkem 146 pacientů, z toho je zde 98 mužů (67 %) a 48 žen (33 %). Medián věku při záchytu je 62 let, nejmladší pacient měl v době záchytu onemocnění 33 let (pacient č. 45) a nejstarší pacient 79 let. Z celého souboru bylo 6 osob léčeno v předchozích letech i pro jinou malignitu, z toho 4 osoby byly pro danou malignitu léčeny ozařováním a dvě osoby chemoterapeuticky.

Při záchytu onemocnění bylo 41 osob dle hodnocení podle Raie ve stádiu 0; 61 osob ve stádiu 1; 19 osob ve stádiu 2; 16 osob ve stádiu 3 a 9 osob ve stádiu 4. Medián doby od záchytu onemocnění po začátek léčby je v rámci celého souboru 14 měsíců. Medián doby sledování léčby od záchytu po současnost je v rámci tohoto souboru 52 měsíců.

Po první linii léčby nastala kompletní hematologická remise u 72 osob (49 %), 29 osob (20 %) bylo po léčbě první linie v parciální remisi a 44 osob (30 %) bylo léčeno jen symptomaticky. U pacienta č. 43 nebyla zjištěna aktuální úspěšnost léčby. V současné době je naživu 120 osob (82 %) z celkového počtu 146. Na následky CLL zemřelo 24 osob (16 %) s mediánem přežití 41 měsíců. Medián přežití informuje o době, která uplynula od stanovení diagnózy po úmrtí pacienta.

9.2 Vyhodnocení výsledků metody FISH

9.2.1 Četnost jednotlivých aberací

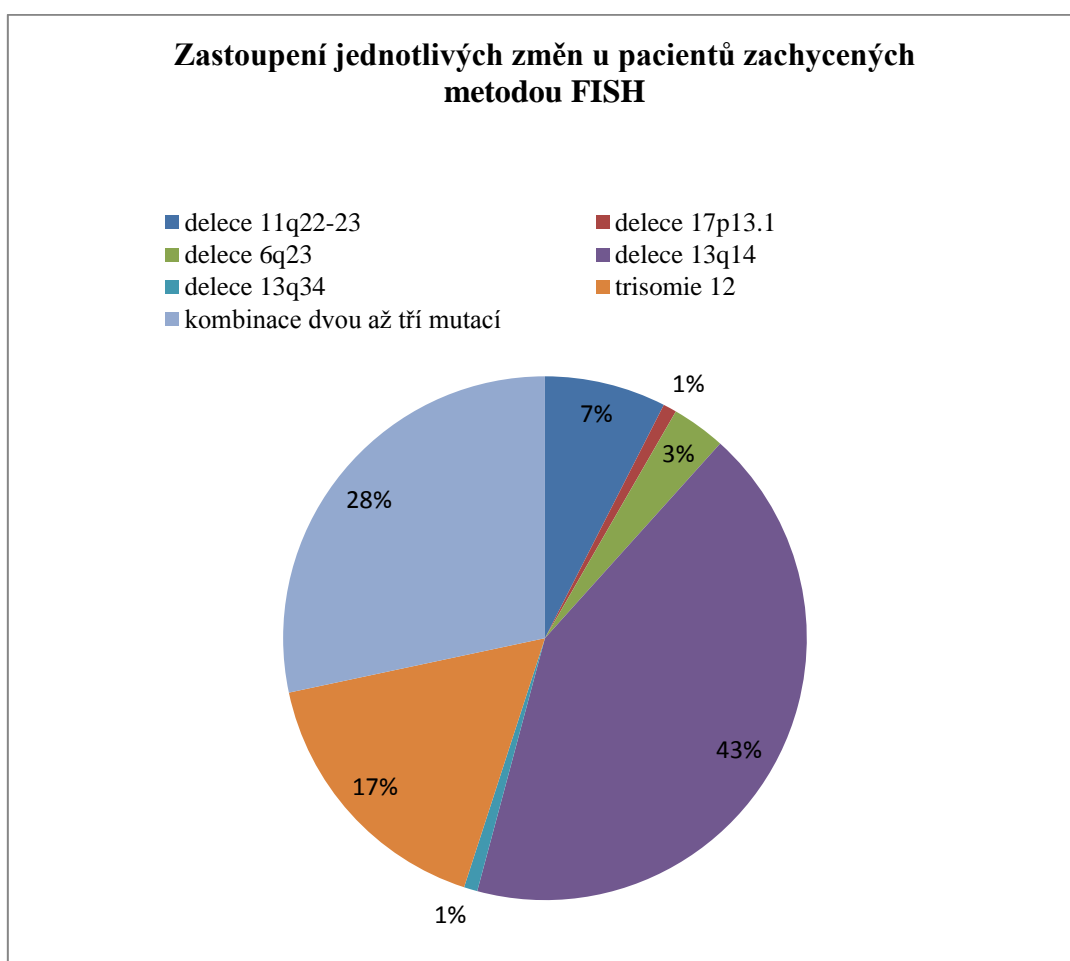
Vyhodnotili jsme z tabulky č. 4 výsledky zachycené metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) u 146 pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. U pacienta č. 39 nebyly výsledky z této metody dostupné. Zjišťovali jsme, zda byly na základě tohoto molekulárně-cytogenetického vyšetření zachyceny delece jednotlivých genů, případně trisomie 12. chromosomu. Dále jsme tyto mutace roztřídili dle toho, zda byly objeveny jako samostatné, anebo v kombinaci s další mutací.

U 29 pacientů (20 %) ze 145 hodnocených pacientů nebyla metodou FISH diagnostiky zachycená žádná hledaná změna. U zbylých 116 byly tyto chromosomové

změny zachyceny v různém zastoupení. Z tohoto počtu mělo 83 pacientů (72 %) pouze jednu samostatnou mutaci, u 29 pacientů (25 %) byly zachyceny dvě mutace a u 5 pacientů (3 %) byla zachycena kombinace tří mutací.

Dle vytvořeného grafu č. 1 (viz níže) lze zjistit, že u pacientů se samostatnou mutací se nejvíce vyskytovala delece 13q14 (D13S319) a to u 43 % pacientů a druhá nejčastější byla trisomie chromosomu 12 u 17 % pacientů. Delece 11q22-23 (ATM) byla nalezena u 7 % pacientů. U 3 % pacientů byla nalezena delece 6q23 (SEC63), u 1 % se vyskytovala delece 17p13.1 (TP53) a u 1 % pacientů byla zachycena delece 13q34 (LAMP1).

Graf 1: Poměrné zastoupení jednotlivých chromosomových změn zachycených metodou FISH



Delece 11q22-23 (ATM)

Monoalelická delece 11q22-23 (gen *ATM*) byla nalezena u 31 pacientů, z čehož u 9 pacientů (7 %) byla přítomna jako samostatná mutace. Zbylí pacienti měli přítomné dvě až tři mutace zároveň. U 15 pacientů byla společně s delecí *ATM* prokázána delece 13q14 a 3 pacienti měli zároveň s delecí *ATM* přítomnou delecí 6q23.

Pacient č. 2 měl zároveň s delecí *ATM* také přítomnou bialelickou delecí 13q14 v 1. klonu a monoalelickou delecí 13q14 ve 2. klonu. U pacienta č. 85 byla odhalena kombinace všech tří mutací - delece *ATM*, delece 13q14 a také delece 6q23. U pacienta č. 138 byla prokázána kombinace delece *ATM*, delece *TP53* a zároveň delece 6q23. Pacient č. 142 měl v karyotypu prokázanou delecí *ATM* a delecí 13q14 ve 2. klonu a k tomu navíc trisomii 12.

Delece 17p13.1 (TP53)

Delece 17p13.1 (gen *TP53*) v monoalelické formě byla nalezena u 7 pacientů, z nichž pouze pacient č. 3 měl tuto mutaci přítomnou samostatně. U 4 pacientů byla prokázána delece *TP53* spolu s delecí 13q14. U pacienta č. 89 byla prokázána delece *TP53* a delece 6q23.

Delece 6q21 (MYB)

Diagnostika delece 6q21 (gen *MYB*) byla provedena u 10 pacientů a u žádného z nich nebyla zjištěna delece tohoto genu. Do grafu č. 1 tedy nebyla tato delece zaznamenána a data o těchto pacientech byla přiřazena do skupiny beze změny.

Delece 13q14 (D13S319)

Delece 13q14 (lokus D13S319) v 1. klonu byla nalezena u 74 pacientů, z čehož u 68 pacientů byla tato delece přítomna jako monoalelická a u 6 byla delece nalezena v bialelické formě.

Jako samostatná mutace byla delece 13q14 přítomna u 48 pacientů, u 3 z nich proběhla delece obou alel genu. Delece 13q14 v tomto klonu se objevila v kombinaci s delecí 6q23 u 3 pacientů a s trisomií 12 u pacienta č. 114. U pacienta č. 139 se delece 13q14 objevila jak v 1. tak i ve 2. klonu a navíc se zde vyskytovala trisomie 12.

Ve 2. klonu nádorových buněk se tato mutace 13q14 objevila u 6 pacientů, z nichž u 3 z nich byla tato mutace nalezena jako samostatná bialelická a u dalších 3 z nich se vyskytovala jako monoalelická delece v kombinaci s dalšími změnami.

Delece 13q34 (LAMP1)

Delece 13q34 (LAMP1) byla přítomna pouze u pacienta č. 55.

Trisomie chromosomu 12 (D12Z3)

Trisomie chromosomu 12 (lokus D12Z3) byla diagnostikována u 24 pacientů, z čehož u 20 se tato mutace objevovala samostatně. U pacienta č. 68 byla navíc zjištěna delece 6q23.

Delece 6q23 (SEC63)

Jako poslední byla zjišťována metodou FISH delece genu 6q23 (SEC63) a to u 33 pacientů z celkových 146. Tato delece v monoalelické formě byla nalezena u 14 pacientů, z nichž pouze u 4 byla přítomna jako samostatná mutace.

9.2.2 Analýza významu nalezených mutací

V tabulce č. 5 (viz níže) jsou zaznamenány nalezené chromosomové změny u pacientů s CLL zachycené metodou FISH. U jednotlivých mutací je uveden počet případů a počet zemřelých. Dále jsou u každé aberace vypočteny mediány doby od záchytu CLL do zahájení léčby, mediány doby sledování a mediány doby přežití u zemřelých pacientů, případně zda byly nějaké osoby s danou mutací léčeny i pro jiné maligní onemocnění. Nejdříve jsou uvedeny údaje u samostatných aberací a poté u komplexních změn. Tytéž hodnoty jsou v závěru tabulky sledovány i u pacientů, u kterých za pomoci metody FISH nebyly nalezeny žádné změny.

Tabulka 5: Hodnoty u jednotlivých chromosomových změn

	počet případů	počet zemřelých	medián doby od záchytu do zahájení léčby	medián doby sledování	medián doby přežití -u zemřelých	léčba pro jinou malign. -počet osob
samostatná delece 11q22-23	9	3 (33%)	2	50,5	47	2
samostatná delece 17p13.1	1	1(100%)	13		58	
samostatná delece 13q14	48	2(4%)	11	53	59,5	2
samostatná delece 13q34	1	0 (0%)		58		
samostatná trisomie chromosomu 12	20	3 (15%)	8	60	43	2
samostatná delece 6q23	4	1(25%)	7	46	39	

Tabulka 5 (pokračování): Hodnoty u jednotlivých chromosomových změn

	počet případů	počet zemřelých	medián doby od záchytu do zahájení léčby	medián doby sledování	medián doby přežití -u zemřelých	léčba pro jinou malig. -počet osob
dvě chromosomové mutace	28	7(25%)	13	52	34	
delece 11q22-23 a 13q14	15	2(13%)	18	58	37,5	
delece 17p13.1 a 13q14	4	2(50%)	6	60	18,5	
delece 11q22-23 a 6q23	3	2(66%)	14	32	10,5	
delece 13q14 a 6q23	3	0(0%)	4	50		
tři chromosomové mutace	5	2(40%)	1,5	25	38,5	
beze změny při FISH	29	5(17%)	4,5	50	49	
beze změny při FISH i G-pruhování	20	3(15%)	7	46	49	
beze změny při FISH, se změnami při G-pruhování	9	2(22%)	4	50	49,5	

Medián doby od záchytu onemocnění po léčbu

Z tabulky č. 5 je zřejmé, že nejkratší medián doby od záchytu onemocnění po léčbu byl zachycen u pacientů s kombinací tří chromosomových změn (1,5 měsíce) a naopak nejdelší bylo toto období u kombinace delece 11q22-23 a 13q14 (18 měsíců).

Medián doby sledování

Nejkratší dobu (25 měsíců) byli sledováni pacienti se třemi chromosomovými mutacemi. Nejdelší medián doby sledování (60 měsíců) byl zjištěn u samostatné trisomie chromosomu 12 a ten samý údaj byl vypočten také u pacientů, kteří měli současně delecii 17p13.1 a 13q14.

Medián přežití

Nejkratší medián přežití (10, 5 měsíce) byl nalezen u současně nalezené kombinace delece 11q22-23 a 6q23, nejdelší medián přežití měli pacienti se samostatnou delecí 13q14 (59, 5 měsíce).

Počet zemřelých

Početně nejvíce zemřelých (7 lidí) bylo zachyceno u kombinace dvou chromosomových změn. Avšak procentuálně vzato, nejhorší výsledky (100 %) byly nalezeny u samostatné delece 17p13.1, kdy byl diagnostikován pouze 1 pacient s touto

aberrací, který poté na následky CLL zemřel. Velmi nepříznivá je také v souboru kombinace delece 11q22-23 a delece 6q23, kdy bylo zemřelých až 66 % a druhá nejhorší je kombinace delece 17p13.1 a 13q14 (50 % zemřelých). Naopak nejnižší počet pacientů, kteří podlehli této nemoci, byl nalezen u delecí zahrnujících chromosom 13, čili delece 13q14 a delece 13q34.

Léčba pro předchozí malignitu

Pro předchozí malignitu bylo radioterapeuticky a chemoterapeuticky léčeno celkem 6 osob. Čtyři pacientky stále žijí, jedná se o pacientky s delecí 13q14 (č. 72 a č. 126) a pacientky s trisomií chromosomu 12 (č. 37 a č. 99). Dvě pacientky (č. 24 a č. 25) se samostatnou delecí 11q22-23, zemřely na následky CLL.

Pacienti beze změn při FISH

Z tabulky č. 5 vyplývá, že metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) nebyla diagnostikována žádná změna u 29 případů. Celkem 20 z těchto pacientů nemělo žádnou změnu zachycenou ani při G-pruhování, v této skupině však zemřeli 3 lidé, s mediánem přežití 49 měsíců.

Se změnou v G-pruhování bylo zaznamenáno 9 případů, z nichž 2 zesnulí pacienti přežili 49,5 měsíce od začátku léčby, tedy obdobně jako u předchozí skupiny. V G-pruhování se u těchto pacientů objevila translokace t(14;19), t(18;14) a také t(7;13). Při použití této pruhovací metody byla dále zachycena delece na chromosomu 6, ztráta chromosomu 17 a nadbytečný chromosomový materiál na chromosomech 18 a 5. V karyotypu pacientů se také objevily derivované chromosomy 10 a 12 a v karyotypu dvou pacientů byly nalezeny neidentifikovatelné (marker) chromosomy. Žádná z těchto změn se v tomto souboru těchto devíti pacientů neopakovala.

10 DISKUZE

Tato bakalářská práce na téma „Význam cytogenetických vyšetření nádorových buněk u pacientů s vybranými hematologickými malignitami“ je převážně zaměřena na výzkum cytogenetických vyšetření u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Hlavním úkolem bylo provést základní statistické vyhodnocení z poskytnutých anonymních dat a odpovědět na výzkumné otázky. K danému souboru jsme stanovili dvě výzkumné otázky: Jaké jsou nejčastější chromosomové aberace vyskytující se u zkoumaného souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií? Odpovídá jejich prognostický význam pro pacienta očekávání?

Na obě otázky je možné díky našim výsledkům odpovědět, avšak k přesným závěrům by měla sloužit rozsáhlejší studie s ještě větším počtem pacientů, která by na tuto práci mohla navázat. V diskuzi budeme srovnávat nejen samotné výsledky mezi sebou, ale srovnáme je také s výsledky studií jiných autorů, převážně zahraničních, kteří se touto problematikou zabývali.

V hodnoceném souboru 146 pacientů s CLL, bylo dvakrát více mužů než žen. Mužů bylo celkem 98 (67 %) a žen 48 (33 %), čili muži byli vůči ženám zhruba v poměru 2:1, což odpovídá i poměrům udávaným v literatuře, např. dle Indráka et al. (20) je poměr mužů k ženám 1,5-2:1.

Nejmłodší pacient měl v době záchytu onemocnění 33 let a nejstarší pacient 79 let. Medián věku při záchytu byl ze statistiky vypočten na 62 let, což koresponduje i s výsledky dle literatury, např. Adam et al. (19) uvádí medián věku při záchytu 65 let.

Pokud bychom měli zhodnotit medián doby od záchytu po léčbu, dostáváme se také k zajímavým výsledkům. Na následky CLL zemřelo celkem 24 osob (16 %). Chronická lymfocytární leukémie je nicméně často celkem dobře léčitelná, v mnoha případech lze léčbu odložit, což je potvrzeno i dle našich výsledků. Po první linii léčby chemoterapeutiky nastala kompletní či parciální hematologická remise u 101 osob (70 %), zatímco u 44 osob (30 %) bylo léčeno pouze symptomaticky, přičemž tito pacienti měli povětšinou karyotyp beze změn či se samostatnou delecí 13q14, která má dle studie Döhnera et al. (25) nejlepší prognózu co se týče délky přežití. Z tabulky č. 5 (str. 62-53) lze vyčíst, že nejkratší medián doby od záchytu onemocnění po následnou léčbu byl u pacientů s kombinací tří chromosomových změn (1,5 měsíce), což by odpovídalo našim předpokladům, že komplexní změny v takovémto rozsahu vyžadují včasnou léčbu.

Z celého souboru bylo 6 osob v době před zachycením CLL léčeno chemoterapií i radioterapií pro jinou malignitu. Je tedy možné, že tato léčba zřejmě má souvislost s pozdějším vznikem chronické lymfocytární leukémie. Čtyři pacientky z této konkrétní skupiny stále žijí, jedná se o dvě pacientky s delecí 13q14 a dále o dvě pacientky s trisomií chromosomu 12, což jsou chromosomové aberace, u kterých je dle Indráka et al. (20) udávaná relativně dobrá prognóza s dlouhou dobou přežití. Naopak dvě pacientky, u kterých byla diagnostikována samostatná delece 11q22-23, zemřely brzy na následky CLL. Přítomnost delece 11q22-23 obecně znamená špatnou prognózu pro pacienta, což je v tomto případě potvrzeno. (25)

Na tomto místě si můžeme odpovědět na první výzkumnou otázku: **Jaké jsou nejčastější chromosomové aberace vyskytující se u zkoumaného vzorku pacientů s chronickou lymfocytární leukémií?**

Z našich výsledků na základě metody FISH vyplývá, že ze 145 hodnocených pacientů, jich 29 (20 %) bylo beze změn, jednu změnu mělo 83 pacientů (72 %), dvě změny byly u 29 pacientů (25 %) a nejméně bylo pacientů s kombinací tří mutací (u 5 pacientů - 3 %).

Jako samostatná aberace se v našem souboru nejvíce vyskytovala delece 13q14 a to u 43 % pacientů a druhá nejčastější byla trisomie chromosomu 12 u 17 % pacientů. Delece 11q22-23 byla nalezena u 7 % pacientů. U 3 % pacientů byla nalezena delece 6q23, a nejméně zastoupené byly delece 17p13.1 a delece 13q34. Delece 6q21 (MYB) nebyla u žádného pacienta nalezena. Naše výsledky odpovídají předpokladům, neboť dle studie Döhnera et al. (25) je poměrné zastoupení jednotlivých mutací obdobné. U pacientů s více aberacemi se nejvíce vyskytovala kombinace delece 11q22-23 a 13q14.

Druhá výzkumná otázka zněla: **Odpovídá jejich prognostický význam pro pacienta očekávání?**

Na tuto otázku jsme se dle našich výsledků pokusili odpovědět pomocí určení mediánu doby přežití u pacientů s jednou nalezenou změnou.

Nejhorších výsledků, tzn. nejkratšího mediánu přežití, vykazovala delece 6q23 (pouze 39 měsíců). Prognóza pro delecí 6q zatím nebyla dle výzkumů jednoznačně stanovena. Náš výsledek by mohl naznačovat spojení se špatnou prognózou a dalším postupem by mělo být ověření na větším počtu pacientů.

Druhý nejkratší medián přežití (43 měsíců) byl zjištěn u samostatné trisomie chromosomu 12, která je považována dle současných studií (27) jako aberace se střední či spíše lepší prognózou srovnatelnou zhruba s delecí 13q14, tento výsledek tudíž neodpovídal zcela našim očekáváním.

Medián přežití u samostatné delecce 11q22-23 je dle výsledků ze zkoumaného souboru 49 měsíců, tato skutečnost řadí pacienty zhruba do střední či horší prognózy, což odpovídá i našim očekáváním.

Dle našich výsledků má samostatná delecce 17p13.1 jeden z nejdelších mediánů přežití (58 měsíců), naopak dle studií Döhnera et al. (25) mají mít pacienti s touto delecí nejkratší medián přežití s nejhorsí prognózou. Tuto skutečnost však nelze z našich dat objektivně hodnotit, a to z toho důvodu, že zde byl zachycen pouze 1 pacient s touto samostatnou delecí, který později na následky CLL zemřel.

Prognóza nemocných se samostatnou delecí 13q14 (a 13q34) je dle našich výsledků nejlepší, neboť v této skupině bylo nejméně zemřelých pacientů s nejdelší dobou přežití i s dobou sledování od záchytu onemocnění. Tento výsledek odpovídá i výsledkům výzkumu dle Döhnera et al. (25), kde se delecce 13q řadí mezi příznivé prognostické faktory.

Překvapivé byly výsledky pacientů, kteří nemají žádné nalezené změny pomocí aplikovaných metod. Prognóza těchto pacientů by měla být relativně dobrá, dle našeho výzkumu ale pacienti beze změn při FISH mají medián doby přežití téměř srovnatelný s delecí 11q22-23. Roli zřejmě v tomto případě hrály i jiné genové mutace, které nebyly zachycené touto metodou, a také jiné faktory než genetické.

Pokud bychom však komplexně zhodnotili soubor dle mediánu přežití, nejhorsích výsledků dosáhli pacienti se současně nalezenou kombinací delecce 11q22-23 a 6q23, u kterých byl medián přežití pouhých 10,5 měsíce, naopak nejdéle ze všech přežili pacienti se samostatnou delecí 13q14, což jsme i předpokládali. Zajímavé je také zjištění, že pacienti se třemi nalezenými mutacemi měli delší medián přežití (38, 5 měsíce), než pacienti, kteří měli pouze dvě nalezené mutace (34 měsíců). Zde opět mohly mít významný vliv i jiné faktory, které nebyly našimi metodami odhalené, popřípadě mohlo jít o kombinace některých mutací s příznivou prognózou.

ZÁVĚR

Zásadním prvkem této práce bylo vystihnout důležitost cytogenetických vyšetření u vybraných hematologických malignit, konkrétně jsme se zaměřili na leukémie. Pro tento výzkum a jeho následnou statistiku, bylo hlavním cílem sestavit soubor pacientů, ze kterého budou všechny odpovědi na výzkumné otázky vycházet. Tento cíl se podařilo splnit. Výsledkem jsou rozsáhlé tabulky zahrnující veškeré potřebné informace (viz tabulka č. 3 a č. 4). Důležité pro nás byly informace o věku pacienta, jeho pohlaví a základní souhrn průběhu léčby. Dále byla pro výzkum podstatná data záchytu onemocnění a případná data úmrtí, ale především nás zajímali cytogenetické nálezy.

Dalším cílem bylo naučit se interpretovat karyotypy pacientů a analyzovat cytogenetické aberace v sestaveném souboru pacientů. Tento cíl se také podařilo splnit a dle zjištěných chromosomových aberací byli pacienti roztrženi do několika skupin.

Splnění všech vytyčených cílů vedlo k úspěšnému zodpovězení na obě výzkumné otázky. První výzkumná otázka se týkala četnosti jednotlivých cytogenetických aberací v souboru a druhá otázka se týkala prognózy u těchto změn. Zajímalo nás, zda budou naše výsledky odpovídat očekávání na základě výsledků jiných studií, anebo zda a v čem se budou lišit. Nejčastěji se v souboru pacientů nacházela delece 13q14, která měla zároveň nejlepší prognózu, co se týče délky přežití. Druhá nejčastější byla trisomie chromosomu 12 s relativně špatnou prognózou a malé procento pacientů mělo delecii 11q22-23 se střední prognózou. Ještě méně bylo pacientů s delecii 6q23, kteří měli dle našich výsledků nejhorší prognózu. Nejméně zastoupené byly delece 17p13.1 a delece 13q34, které se dle malého počtu vyšetřených pacientů obtížně hodnotily. Naše očekávání byla splněna jen v některých případech, nepotvrzená očekávání byla podrobněji rozebrána v diskuzi.

Jak již z názvu vyplývá, záměrem této bakalářské práce bylo stanovení a definování významu cytogenetických vyšetření u pacientů s hematologickými malignitami, a to na základě získaných poznatků a informací. Cytogenetická vyšetření jsou významnou součástí diagnostiky hematologických onemocnění. Dle cytogenetických nálezů lze upřesnit typ malignity, v tomto případě o jaký typ leukémie se jedná. Průběh léčby může být významně ovlivněn chromosomovými aberacemi, a proto je důležité tyto změny pomocí cytogenetických metod včas zachytit a aplikovat optimální léčbu. Dalším přínosem těchto metod je, že pomocí nich lze dobře sledovat úspěšnost dané léčby a případně vývoj onemocnění.

SEZNAM ZDROJŮ

1. KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 9788024618807.
2. MICHALOVÁ, Kyra. *Úvod do lidské cytogenetiky*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1999, 172 s. ISBN 8070132817.
3. NUSSBAUM, Robert L., Roderick R. MCINNES, Huntington F. WILLARD, James THOMPSON a Margaret Wilson THOMPSON. *Klinická genetika: Thompson & Thompson: 6. vyd.* 1. vyd. Praha: Triton, 2004, 426, lix s. ISBN 8072544756.
4. Insertion (genetics). In: *Wikipedia The Free Encyclopedia* [online] Wikimedia ®. 22. 12. 2015 [vid. 10. 1. 2016].
Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Insertion_\(genetics\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Insertion_(genetics))
5. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007, 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
6. POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER. *Molekulární hematologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2013, 316 s. ISBN 978-80-7262-942-8.
7. KOLEKTIV autorů. *Příprava chromosomových preparátů metodami klasické cytogenetiky* [online] Oddělení lékařské genetiky Brno, 2012 [cit. 10. 1. 2016].
Dostupné z: <http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/genetika/res/f/8-molekularni-cytogenetika.pdf>
8. OTOVÁ, Berta. *Lékařská biologie a genetika*. 1.vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2008, 123 s. ISBN 9788024615943.

9. BICKMORE Wendy A. Karyotype Analysis and Chromosome Banding. In: *Encyclopedia of life sciences* [online]. Nature Publishing Group. © 2001 [cit. 11. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.ege.fcen.uba.ar/wp-content/uploads/2014/05/Karyotype-analysis-Chrom-Banding_Bickmore_2001.pdf
10. GERSEN, Steven L . a Martha B . KEAGLE. *The principles of clinical cytogenetics*. 3. vyd. New York Springer, 2013, 569 s . ISBN 978-1-4419-1687-7 .
11. SHAFFER, Lisa G , Jean MCGOWAN-JORDAN a M. SCHMID (eds.). *ISCN 2013: an international systém for human cytogenetic nomenclature (2013)*. Unionville, CT: Karger, 2013, 140 s, ISBN 978-3-318-02253-7.
12. KUGLÍK, Petr. *Vybrané kapitoly z cytogenetiky*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 168 s. ISBN 8021023341.
13. FISH (Fluorescence in Situ Hybridization). In: *Semrock* [online]. Semrock. [vid. 11. 2. 2016]. Dostupné z: <https://www.semrock.com/fish.aspx>
14. MAYER, Jiří a Jan STARÝ. *Leukemie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002, 392 s. ISBN 8071699918.
15. PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 424 s ., 64 s . obr. příl. ISBN 978-80-247-3459-0
16. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, 164 s ., [4] s. obr. příl. ISBN 978-80-247-3533-7.
17. Hematopoiesis simple. In: *Wikimedia commons* [online]. Wikimedia commons, 2007 [vid. 11. 2. 2016]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_simple.png

18. ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010, xxi, 417 s. ISBN 978-80-7262-648-9.
19. ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2. dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008, 390 s., xs. fotogr. příl.:. ISBN 9788024725024.
20. INDRÁK, Karel, Štefan ALUŠÍK (ed.) a Magdaléna LEJSKOVÁ (ed.). *Hematologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 2006, 278 s., [9] s. barev. obr. příl. Postgraduální klinický projekt. ISBN 80-7254-868-9 .
21. DOUBEK, Michael (ed.) a Jiří MAYER (ed.). *Postupy diagnostiky a léčby leukemií a jejich infekčních komplikací u dospělých pacientů: doporučení České leukemické skupiny - pro život (CELL)*. 2., přeprac. vyd. Brno: Česká leukemická skupina - pro život, 2013, 162 s. ISBN 978-80-260-4744-5.
22. VOKURKA, Samuel. *Základní hemato-onkologická onemocnění a jejich charakteristiky*. 1. vyd. Praha: Galén, 2008, 89 s. ISBN 978-80-7262-553-6.
23. SEER Stat Fact Sheets: Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). In: *National Cancer Institute -Surveillance, Epidemiology and End Result Program* [online] National Cancer Institute. [cit. 15. 2. 2016]. Dostupné z:
<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>
24. KOZÁK, Tomáš, 2008. Chronická lymfocytární leukémie. In: *Onkologie* [online] 2008, č. 2(3), str. 156-163. ISSN - 1803-5345. [cit. 20. 2. 2016]. Dostupné z:
<http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2008/03/04.pdf>
25. DÖHNER Hartmut et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. In: *The New England Journal of Medicine* [online]. Massachusetts Medical Society © 28. 12. 2000, str. 1910-1916. [cit. 21. 3. 2016]. Dostupné z:
<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM200012283432602>

26. AUSTEN Belinda et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. In: *Journal of Clinical Oncology* [online]. American Society of Clinical Oncology © 1. 12. 2007. vol. 25, no. 34, str. 5448-5457. [cit. 9. 1. 2016]. Dostupné z: <http://jco.ascopubs.org/content/25/34/5448.full>
27. PIUGGROS, Anna, Gonzalo BLANCO a Blanca ESPINET. Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. In: *BioMed Research International* [online]. © 22. 5. 2014 [cit. 1. 3. 2016] Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/435983/>
28. STILGENBAUER, S., et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. In: *Leukemia* [online]. 1999, vol. 13, no. 9, str. 1331-1334. [cit. 1. 3. 2016]. Dostupné z: http://www.nature.com/leu/journal/v13/n9/pdf/2401499a.pdf?origin=publication_detail
29. CRUMP, Michael et al. A Canadian Perspective for the Use of Rituximab in the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. In: *New Evidence in Oncology* [online] 2/2009, č. 11, str. 1-17. [cit. 10. 1. 2016]. Dostupné z: <http://www.newevidence.com/oncology/a-canadian-perspective-for-the-use-of-rituximab-in-the-treatment-of-chronic-lymphocytic-leukemia-2/>
30. PANOVSKÁ, Anna a Michael DOUBEK, 2013. Chronická lymfocytární leukémie-diagnostika a léčba. In: *Onkologie* [online]. 2012, č. 7 (3), str. 117-120. ISSN-1803-5345. [cit. 10. 1. 2016]. Dostupné z: <http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2013/03/04.pdf>
31. ROONEY, D. *Human cytogenetics: a practical approach*. 3. vyd. New York: Oxford University Press, 2001, ISBN 978-0199638406.

SEZNAM ZKRATEK

A - adenin

A- ano (tabulka č. 3, 5. sloupec)

ALL - akutní lymfoblastická leukémie

AML - akutní myeloidní leukémie

array CGH- array comparative genome hybridization (komparativní genomová hybridizace na čipu)

AT- aktinoterapie

ATM - ataxia telangiectasia mutated

BCR/ABL1 - breakpoint cluster region- c-abl oncogene 1

C - cytosin

CCD camera - charge coupled device kamera

CD - cluster of differentiation (diferenční skupina)

CGH - comparative genome hybridization (komparativní genomová hybridizace)

CLL - chronická lymfocytární leukémie

CML - chronická myeloidní leukémie

CNS - centrální nervová soustava

CR - kompletní remise

DAPI - 4',6-diamidin-2-fenylindol (fluorescenční barvivo)

DNA - deoxyribonukleová kyselina

FISH - fluorescence in situ hybridization (fluorescenční in situ hybridizace)

FN - fakultní nemocnice

G - guanin

HRT- high resolution technique (technika s vysokým rozlišením)

CHT- chemoterapie

IgVH- variabilní oblast na těžkém řetězci imunoglobulinu

ISCN - An International System of Human Cytogenetic Nomenclature

kbp - kilobase pair

LAMP1- limbic-system-associated membrane protein 1

M (tabulka č. 3) - muž

M- mol

mBAND - multicolor banding (mnohobarevné pruhování)

mFISH- multicolor fluorescence in situ hybridization (mnohobarevná FISH)

N- ne (tabulka č. 3, 5. sloupec)

N -nežije (tabulka č. 3, 12. sloupec)

NCCN- National Comprehensive Cancer Network

NCI - National Cancer Institute

NK- natural killer (přirození zabíječi)

NOR - nucleolar organiser regions (organizátor jádérka)

p. b (%) - procento patologických buněk

p. k - počet kopií genu

PCR - polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

PR - parciální remise

RNA - ribonukleová kyselina

SKY- spectral karyotyping (spektrální karyotypování)

T- thymin

TP53 - tumor protein (nádorový protein)

WHO - World Health Organization (světová zdravotnická organizace)

ZAP- zeta chain associated protein

Ž - žena (tabulka č. 3, 2. sloupec)

Ž - žije (tabulka č. 3, 12. sloupec)

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klasifikace CLL do stádií dle Raie

Tabulka 2: Klasifikace B -CLL do stádií dle Bineta

Tabulka 3: Soubor pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

Tabulka 4: Cytogenetické nálezy u souboru pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)

Tabulka 5: Hodnoty u jednotlivých chromosomových změn

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Poměrné zastoupení jednotlivých chromosomových změn zachycených metodou FISH

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Inzerce mezi chromosomy 4 a 20

Obrázek 2: G -pruhování chromosomů

Obrázek 3: Grafické znázornění principu FISH (Fluorescence in situ hybridization)

Obrázek 4: Krvetvorba

Obrázek 5: Medián přežití u pacientů s CLL

Obrázek 6: Ideogram G -pruhování u normálního chromosomu č. 7

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: R -pruhování

Příloha 2: C -pruhování

Příloha 3: HRT G -pruhování

Příloha 4: M -FISH

Příloha 5: M -BAND

Příloha 6: Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha 1: R -pruhování

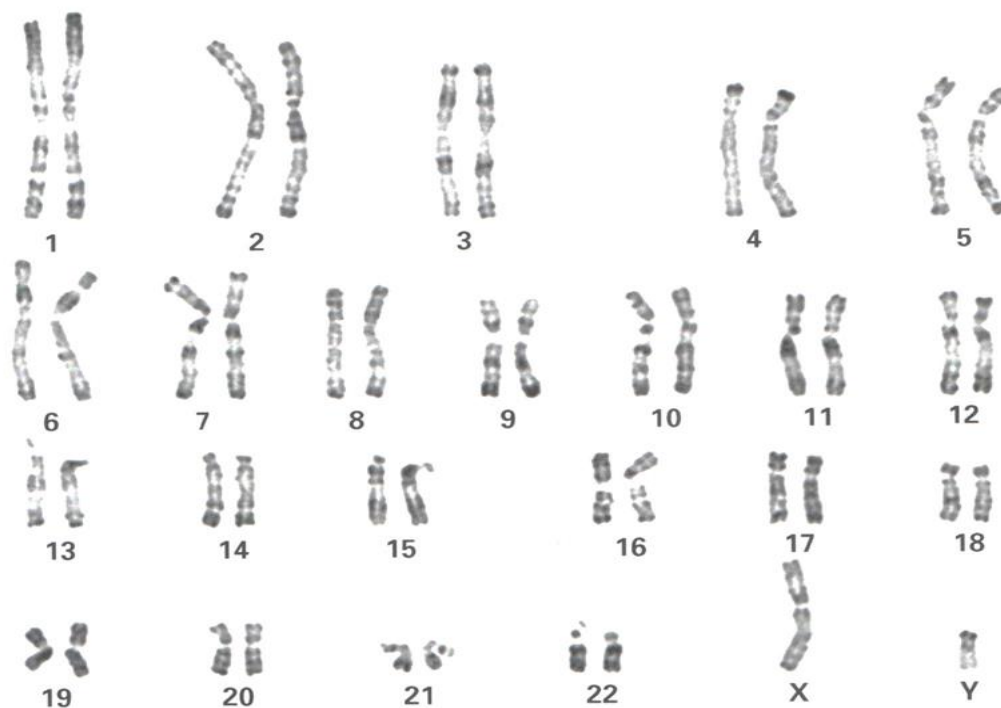


Fig. 3. R-banded human karyogram. (Courtesy of Dr. M. Prieur.)

Zdroj: (11)

Příloha 2: C -pruhování

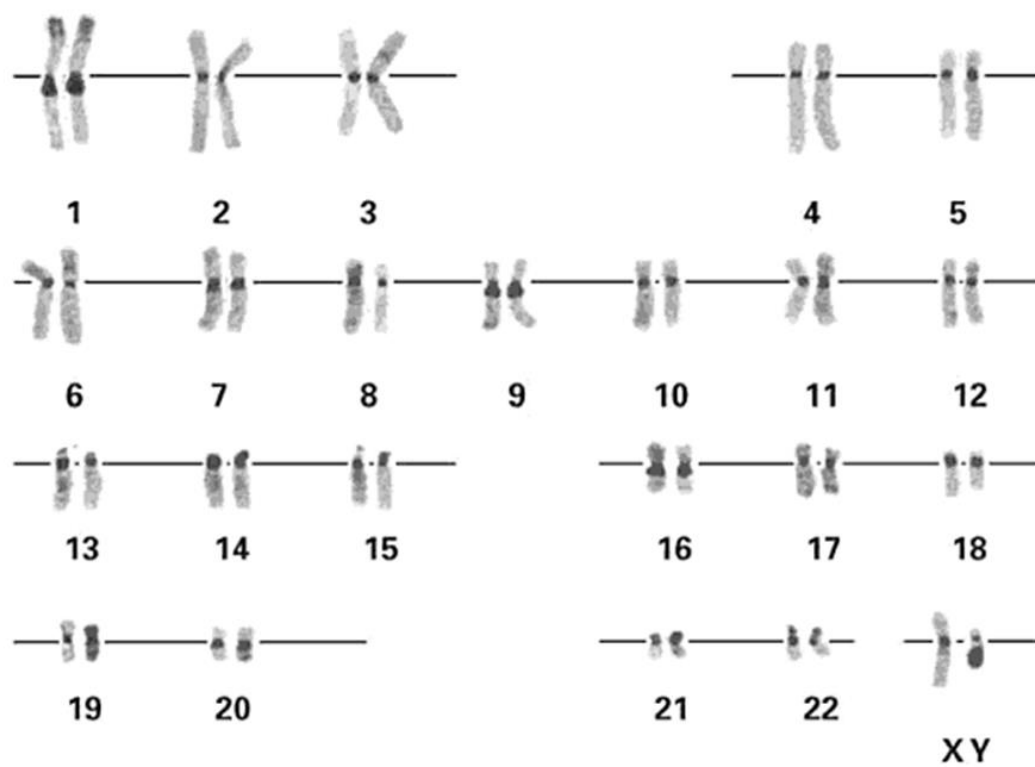


Fig. 4. C-banded human karyogram. (Courtesy of Dr. N. Mandahl.)

Zdroj: (11)

Příloha 3: HRT G -pruhování

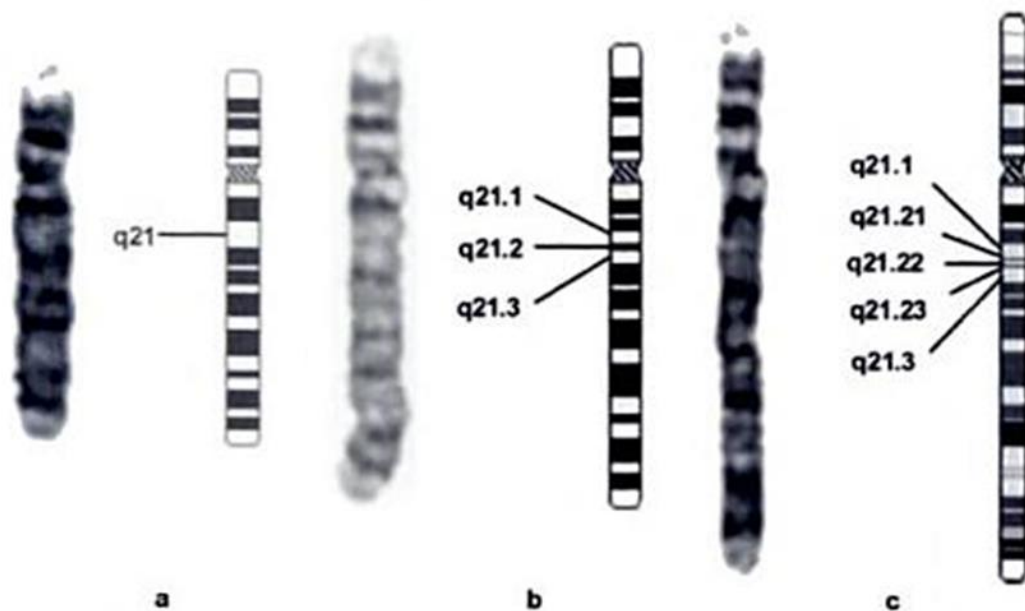


Figure 5 Chromosome 4 shown at increasing levels of resolution approximating to: (a) 400, (b) 550 and (c) 850 bands per haploid set. Note the subdivision of bands and sub-bands as resolution increases.

Zdroj: (31)

Příloha 4: M-FISH



Zdroj: (10)

Příloha 5: M -BAND



Zdroj: (10)

Příloha 6: Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Miriám Demková

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem informací o léčebných metodách, používaných u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Tento souhlas je vydáván pouze v souvislosti se sběrem podkladů v *Ústavu lékařské genetiky (ÚLG) FN Plzeň*, za účelem vypracování Vaší bakalářské práce s názvem „*Význam cytogenetických vyšetření nádorových buněk u pacientů s vybranými hematologickými malignitami*“, při splnění níže uvedených podmínek.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka ÚLG souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je RNDr. Pavel Dvořák, odb. prac. v laboratorních metodách ÚLG FN Plzeň.

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná a je vyjádřením ochoty ke spolupráci oslovených zaměstnanců FN Plzeň s Vámi.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz