

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**Komplexní hodnocení imunitních defektů u nemocných s chronickou
lymfocytární leukémií**

Pavel Vodárek

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: vnitřní nemoci

Hradec Králové
2023

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu vnitřní nemoci na IV. interní hematologické klinice Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Pavel Vodárek
IV. interní hematologická klinika
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: doc. MUDr. David Belada, Ph.D.
IV. interní hematologická klinika
Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR dne
..... v od hod.
(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)

Tato práce vznikla za podpory grantu MH CZ - DRO (UHHK, 00179906) a programu Cooperatio, vědní oblast ONCO.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu vnitřní nemoci
Garant studijního programu

Obsah

1. Obsah	2
2. Souhrn	3
3. Summary	4
4. Úvod do problematiky	5
4.1. Hypogamaglobulinémie	5
4.2. Změny počtu T-lymfocytů a NK buněk	7
5. Cíle disertační práce	9
6. Materiál a metodika	9
6.1. Laboratorní metody	9
6.2. Statistické zpracování	10
6.3. Charakteristika souboru nemocných	10
7. Výsledky	12
7.1. Sérové koncentrace imunoglobulinů	12
7.1.1. Vliv aktivity choroby a léčby 1. linie na koncentrace imunoglobulinů	13
7.1.2. Souvislost koncentrací imunoglobulinů a infekčních komplikací	14
7.1.3. Prognostický význam sérových koncentrací imunoglobulinů	14
7.1.4. Souvislost sérových koncentrací imunoglobulinů a prognostických ukazatelů	16
7.2. Buněčné populace	16
7.2.1. Poměry zastoupení buněčných populací a jejich prognostický význam	16
7.2.2. Změny jednotlivých buněčných populací při progresi onemocnění	17
7.2.3. Změny buněčných populací v důsledku léčby 1. linie.	21
7.2.4. Srovnání vlivu různých léčebných režimů na buněčné populace	22
7.2.5. Souvislost počtů buněk a infekčních komplikací	23
7.2.6. Prognostický význam počtů buněk	23
7.2.7. Souvislost počtů buněk a prognostických ukazatelů	25
8. Diskuse	25
8.1. Sérové koncentrace imunoglobulinů	25
8.2. Buněčné populace	27
9. Závěry	31
10. Použitá literatura	32
11. Přehled publikační činnosti autora	40
11.1. Původní vědecké práce v impaktovaném časopise	40
11.2. Ostatní práce v impaktovaném časopise	40
11.3. Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise	41
11.4. Ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise	41
11.5. Přednášky	41
11.6. Plakátová sdělení na odborných setkáních	41
11.7. Abstrakta	42

2. Souhrn

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je spojena s významným kombinovaným imunodeficitem. Mezi nejdůležitější defekty patří hypogamaglobulinémie a změny absolutního a relativního počtu lymfocytárních populací a subpopulací. Důsledkem těchto změn může být vyšší frekvence infekcí a progresu choroby samotné. Dopad chemoimunoterapie (CHIT) na koncentrace imunoglobulinů (Ig) a populace lymfocytů nebyl dosud dostatečně prozkoumán. V rámci disertační práce byly analyzovány koncentrace Ig a metodou průtokové cytometrie populace lymfocytů u 45 nemocných s neaktivní CLL a 90 nemocných s progredující CLL indikovanou k léčbě. U 58 nemocných byl hodnocen vliv 1. linie léčby pomocí CHIT. Pro vyšetření populací lymfocytů byl k dispozici soubor 34 zdravých kontrol. Pacienti s progredující chorobou měli významně nižší koncentrace všech tříd a podtříd Ig, než pacienti s neaktivní chorobou: IgG, medián 6,96 vs. 9,86 g/l, $p=0,0001$; IgA, medián 0,63 vs. 1,53 g/l, $p<0,0001$; IgM, medián 0,36 vs. 0,57 g/l, $p=0,0035$. Po léčbě se medián IgA zvýšil z 0,59 g/l na 0,74 g/l ($p=0,0031$). Koncentrace ostatních tříd a podtříd Ig se významně nezměnily. Nižší koncentrace IgG2 u nemocných s progredující CLL byla asociována s kratším celkovým přežitím ($p=0,043$) a byl patrný trend ke kratšímu času do první léčby u nemocných s neaktivní CLL s nižší koncentrací IgA2 ($p=0,056$). Mezi nemocnými s progredující chorobou měli ti s nepříznivými prognostickými znaky (nemutovanými IGHV, mutací *TP53*, delecí 11q, nebo 17p) vyšší koncentrace některých tříd a podtříd Ig.

Pacienti s CLL měli ve srovnání s kontrolami vyšší počty většiny analyzovaných buněčných populací. U progredující CLL byl ve srovnání s neaktivní patrný další nárůst počtů většiny populací s výjimkou relativního počtu naivních T-lymfocytů (T-ly). Po léčbě došlo k dalšímu poklesu relativního počtu naivních T-ly, naopak se zvýšil počet efektorových paměťových T-ly (TEM). U pacientů s neaktivní chorobou byl vyšší relativní počet naivních $CD4^+$ T-ly ($p=0,0026$) a naivních $CD8^+$ T-ly ($p=0,023$) asociován s delším časem do první léčby. Vyšší absolutní počet $CD4^+$ centrálních paměťových T-ly (TCM) ($p=0,027$) a TEM ($p=0,003$) a vyšší relativní počet $CD4^+$ TEM ($p=0,0047$) byly spojeny s kratším časem do první léčby. U léčených nemocných byl zvýšený absolutní počet regulačních T-ly asociován s kratším časem do další léčby ($p=0,042$) a zvýšený absolutní počet $CD4^+$ TCM s kratším časem do další léčby ($p=0,035$) i kratším celkovým přežitím ($p=0,041$). Na rozdíl od koncentrací Ig měli pacienti s nepříznivými prognostickými znaky změny lymfocytárních populací odpovídající progredujícímu onemocnění.

3. Summary

Complex evaluation of immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is associated with significant combined immunodeficiency. Amongst most important immune defects are hypogammaglobulinemia and changes in relative and absolute counts of different lymphocyte populations and subsets. As consequence of these changes, there can be higher frequency of infections and progression of CLL itself. The impact of chemoimmunotherapy (CIT) on immunoglobulin (Ig) levels and lymphocyte populations has not been extensively studied. In this dissertation thesis, we analysed Ig levels and lymphocyte populations (using flow cytometry) in 45 patients with indolent untreated CLL and 90 patients with progressive disease indicated for treatment. In 58 patients, we evaluated the impact of first-line CIT. For lymphocyte populations' analysis, we had also cohort of 34 healthy controls. Patients with progressive disease had significantly lower levels of all Ig classes and subclasses than patients with inactive disease: IgG, median 6.96 vs. 9.86 g/l, $p=0.0001$; IgA, median 0.63 vs. 1.53 g/l, $p<0.0001$; IgM, median 0.36 vs. 0.57 g/l, $p=0.0035$. After treatment, median IgA increased from 0.59 g/l to 0.74 g/l ($p=0.0031$). Other Ig classes and subclasses did not change significantly. Lower IgG2 was associated with shorter overall survival in patients with progressive disease ($p=0.043$) and there was a trend towards shorter time to first treatment in stable patients with lower IgA2 ($p=0.056$). Amongst cohort with progressive disease, patients with unfavourable prognostic markers (unmutated IGHV genes, *TP53* mutation, and deletion of 11q or 17p) had higher levels of some of the Ig classes and subclasses.

CLL patients had a significant increase of most cell populations in comparison to controls. The progression of CLL was characterized by significantly elevated counts with the exception of a lower percentage of naïve T-cells. After treatment, the percentage of naïve T-cells further decreased at the expense of effector memory T-cells (TEM). In patients with indolent CLL, higher percentages of naïve CD4⁺ ($p=0.0026$) and naïve CD8⁺ ($p=0.023$) T-cells were associated with a longer time to first treatment. The elevation of CD4⁺ central memory T-cells (TCM) ($p=0.027$) and TEM ($p=0.003$) counts and a higher percentage of CD4⁺ TEM ($p=0.0047$), were linked with shorter time to first treatment. In treated patients, the increased regulatory T-cells count was associated with a shorter time to next treatment ($p=0.042$), while higher CD4⁺ TCM count with shorter time to next treatment ($p=0.035$) and a shorter overall survival ($p=0.041$). Unlike with Ig levels, patients with unfavourable prognostic markers had changes in lymphocyte populations similar to these seen in disease progression.

4. Úvod do problematiky

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější leukémií dospělé populace v západním světě (1). Medián věku v době diagnózy se pohybuje mezi 65 a 72 lety a asi dvakrát častěji postihuje muže (1). V průběhu choroby dochází k akumulaci klonálních lymfocytů s typickým imunofenotypem (CD5⁺, CD19⁺, CD23⁺) v kostní dřeni, periferní krvi a lymfatických orgánech, tedy zejména v lymfatických uzlinách, slezině a játrech (2, 3).

Průběh choroby a prognóza nemocných jsou velmi variabilní – někteří pacienti umírají brzy po diagnóze, zatímco jiní přežívají i bez jakékoliv léčby řadu let (4). Z toho důvodu bylo již popsáno mnoho prognostických ukazatelů, které pomohou odhadnout agresivitu choroby. K nejdůležitějším patří mutační stav genů pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinů (immunoglobulin heavy chain variable region, IGHV), stav genu pro nádorový protein 53 (tumour protein 53, TP53) a pro CLL typické chromozomální aberace – delece chromozomů 11q (del 11q), 13q (del 13q) a 17p (del 17p) a trisomie chromozomu 12 (tri 12) (4). Ke klasickým prognostickým znakům patří i systémy stanovení stádia choroby dle Raie a Bineta (v této práci je dále používán systém Raie) (3, 5). Dosud nebyl prokázán přínos časného zahájení léčby CLL ve smyslu prodloužení celkového přežití (overall survival, OS), proto jsou nemocní s bezpříznakovým, nebo mírným průběhem choroby pouze sledováni (6-9). V první linii léčby byl pro mladé nemocné (přibližně do 65 let věku) bez významných komorbidit dlouho standardem léčby režim FCR (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab) (10). Pro starší nemocné lze použít režim BR (bendamustin, rituximab), který je o něco méně efektivní, ale zároveň také méně toxický (11). Nemocní vysokého věku nebo ti s významnými komorbiditami mohou být v první linii léčeni kombinací chlorambucilu s anti-CD20 monoklonální protilátkou (režimy R-Clb – rituximab, chlorambucil, a O-Clb – obinutuzumab, chlorambucil) (12). V poslední dekádě je nicméně i v první linii léčby patrný posun od výše uvedených režimů chemoimunoterapie (CHIT) směrem k cílené léčbě, tedy zejména inhibitorům Brutonovy tyrosinkinázy (BTKi), nebo venetoklaxu (13-16). V podmínkách úhradových omezení v ČR a také jinde v Evropě jsou však režimy CHIT v některých situacích stále užívány (17).

Dalším typickým rysem CLL je komplexní alterace imunitního systému nemocných. K té dochází jednak primárně vlivem choroby, jednak sekundárně vlivem léčby. Důsledkem je progresse choroby samotné, rozvoj autoimunitních komplikací, vyšší výskyt dalších malignit a zejména pak vyšší riziko infekcí (18-21). Infekce jsou nejčastější příčinou morbidit i mortality nemocných s CLL – infekci prodělá v průběhu onemocnění okolo 80 % pacientů a je až v 60 % případů příčinou jejich smrti (22). Lze předpokládat, že imunitní změny se rozvíjejí postupně s progresí choroby a následně vlivem podané terapie. V časných fázích CLL, kdy nemocný není léčen, ještě nebývají výrazné. Takových pacientů je v současnosti v době diagnózy většina (23). V pokročilých stádiích CLL můžeme očekávat hlubší poruchy imunity a může být problematické odlišit imunodeficit související se základním onemocněním od změn navozených léčbou.

4.1. Hypogamaglobulinémie

Nejdéle známým defektem imunity u CLL je hypogamaglobulinémie, popisovaná již od 60. let minulého století (24). Její prevalence u neléčené CLL se v různých studiích pohybuje v rozmezí 9,9-34,7 % pro imunoglobulin (Ig) G, 12-29,5 % pro IgA a 14,8-54 % pro IgM (25-33).

Ve studiích Rozmana, Andersena a Crassinioho byla zjištěna souvislost nižší koncentrace IgG s kratším OS (28, 29, 34). V řadě dalších prací se ale toto pozorování nepotvrdilo (25-27, 30, 31, 35, 36). Častěji byla pozorována asociace mezi krátkým OS a nízkou koncentrací IgA (28, 29, 31). Nicméně ani to nebylo potvrzeno ve všech studiích (25, 27, 30, 36). Pouze Andersen et al. pozorovali kratší OS u nemocných s deficitem IgM, zatímco ostatní nikoliv (25, 27-31, 34,

36). Některé z těchto studií zkoumaly i spojitost mezi nízkými koncentracemi Ig a kratším přežitím bez léčby (treatment free survival, TFS), nebo časem do první léčby (time to first treatment, TTFT). Parikh et al. zjistili takovou souvislost s koncentrací IgG (nezkoumali ale ostatní třídy Ig), Crassini et al. s koncentracemi IgG, IgM, IgG3 a IgG4, Andersen et al. s koncentrací IgM a většina ostatních s IgA (25, 26, 29-31, 34, 35). V pracích Singha a Francise se podobnou souvislost prokázat nepodařilo (27, 36).

Řada výše citovaných studií hledala také souvislost mezi koncentracemi Ig a výskytem infekcí a výsledky byly podobně rozporuplné. Neprůkazné byly v tomto směru výzkumy Crassinioho a studie Andersena z roku 2016 (29, 34). V následně publikované rozsáhlejší analýze (1204 dosud neléčených pacientů) už ale Andersen et al. pozorovali vyšší riziko infekcí při nízkém IgG, IgA i IgM v univariantní analýze, u IgA pak i v multivariantní analýze (33). V práci kolektivu Andrey Visentin byla vyšší frekvence závažných infekcí (takových, které vyžadovaly hospitalizaci nebo intravenózní antibiotickou terapii) jednak u nemocných po léčbě a dále také u těch s kombinovaným deficitem IgG a navíc buď IgA, nebo IgM (37). Také Hensel, Francis a Freeman popsali vyšší výskyt infekcí u nemocných s hypogamaglobulinémií (zde byla část nemocných již předléčených, na rozdíl od ostatních citovaných studií) (36, 38, 39). V další studii s 899 nemocnými s CLL ve stadiu A dle Bineta sice nebyl pozorován vliv koncentrací Ig v době diagnózy na výskyt infekcí, ty ale byly významně častější u pacientů, u nichž se hypogamaglobulinémie rozvinula až v průběhu sledování (25). Ishdorj et al. zjistili nepřímou souvislost mezi koncentracemi Ig a infekcemi, kdy deficit IgG, nebo IgA byly nezávislým prediktorem budoucí potřeby substituční terapie Ig (31). Ačkoliv tedy nejsou data jednotná, převažují důkazy pro souvislost hypogamaglobulinémie a infekcí, a to zejména u třídy IgA.

Pouze několik málo studií se soustředilo na případnou souvislost hypogamaglobulinémie a známých prognostických faktorů. Mauro et al. nenašli u nemocných s CLL souvislost mezi nízkou hladinou Ig a věkem, pohlavím, hladinou $\beta 2$ mikroglobulinu, pozitivitou ZAP70, nemutovanými IGHV ani prognosticky nepříznivými chromozomálními aberacemi (25). Nízká hladina IgA zde ale byla častější u nemocných se splenomegalií a s pozitivitou CD38 a nízká hladina IgM u těch s vyšším celkovým počtem lymfocytů a ve stádiích 0, I a II dle Raie. Parikh et al. pozorovali nižší IgG u pacientů s vyšší expresí CD49d, s tri 12 a ve stádiích III a IV dle Raie (26). Ostatní chromozomální aberace, věk, pohlaví, pozitivita CD38 či ZAP70 ani mutační stav IGHV s hladinou IgG souvislost neměly. Ishdorj et al. zjistili, že deficity IgA a IgG jsou častější ve vyšších stádiích dle Raie a také u nemocných s IGHV subtypy 1-69, 3-21 a 3-49 (31). Abnormální hladiny IgA byly také spojeny s CD38 pozitivitou a zvýšeným $\beta 2$ mikroglobulinem, abnormální IgM s CD38 pozitivitou a s mutovanými IGHV geny. Chromozomální aberace v této studii vyšetřovány nebyly. Konečně Singh et al. pozorovali častější deficit u pacientů v pokročilých stádiích dle Raie a s vyšším počtem leukocytů (27). Ani zde nebyla případná souvislost s chromozomálními aberacemi zkoumána.

CHIT je obecně považována za faktor zhoršující imunosupresi spojenou s CLL, a to včetně hypogamaglobulinémie. V analýze zahrnující tři různé studie používající fludarabin (71 pacientů), nebo fludarabin v kombinaci s prednisonem (103 pacientů) v první linii léčby CLL, měla po léčbě většina nemocných statisticky významný vzestup koncentrací IgG a IgM (40). Keating et al. monitorovali koncentrace Ig ve studii s režimem FCR pro dosud neléčené nemocné s CLL (41). Šest měsíců po zahájení léčby nepozorovali statisticky významné změny v koncentracích žádné ze tříd Ig. Po 12 měsících od zahájení léčby statisticky významně poklesly (ve srovnání s měřením před léčbou) pouze IgG (všechna tři měření koncentrace IgG byla provedena u 105 pacientů). V retrospektivní analýze 211 nemocných s lymfomy (jen 38

z nich mělo CLL / lymfom z malých lymfocytů), léčených kombinací rituximabu a chemoterapie se podíl nemocných s nízkými IgG po léčbě zvýšil z 15 % na 48 % (42). V případě IgA to bylo z 11 % na 33 % a v případě IgM z 24 % na 52 %. V malé studii s nemocnými s indolentními lymfomy léčenými fludarabinem a rituximabem nedošlo po léčbě ke statisticky významné změně koncentrace IgG, IgA či IgM u 24 z 27 pacientů (43). Velká analýza efektu rituximabu na koncentrace IgG byla provedena u 243 nemocných s autoimunitními chorobami, zejména vaskulitidami (44). Před podáním rituximabu mělo 26 % pacientů koncentraci IgG < 7 g/l, v průběhu sledování se tento podíl zvýšil až na 56 %. Údajů o efektu léčby obinutuzumabem nebo bendamustinem na koncentrace Ig je k dispozici ještě méně. Ve studii GALLIUM byl u nemocných s folikulárním lymfomem pozorován pokles ve všech třídách Ig bez ohledu na použitou protilátku nebo chemoterapeutický základ (bendamustin, nebo cyklofosfamid s doxorubicinem, vinkristinem a prednisonem) (45). Přesná data o míře poklesu ale nejsou k dispozici. Ve studii GAUDI byli nemocní s folikulárním lymfomem léčeni obdobnými režimy chemoterapie, zde ale kombinovanými výhradně s obinutuzumabem (46). Mediány koncentrací všech tříd Ig po indukční fázi léčby poklesly, ale zároveň zůstaly v normálním rozmezí a během udržovací léčby obinutuzumabem nedocházelo k dalšímu poklesu.

Na rozdíl od CHIT byl po léčbě ibrutinibem popsán vzestup koncentrací Ig, konkrétně IgA (47-51). V některých studiích měli také pacienti se vzestupem IgA po léčbě ibrutinibem méně infekčních komplikací (49, 51). V randomizované studii srovnávající monoterapii ibrutinibem s kombinací ibrutinib + rituximab byl vzestup IgA pozorován v obou ramenech (52). V obou ramenech ale došlo také k poklesu koncentrací IgG a v kombinačním rameni i IgM. V ostatních citovaných studiích se koncentrace IgG a IgM po léčbě ibrutinibem významně nezměnily, kromě práce Cassin et al., kde také pozorovali pokles koncentrace IgG (51).

4.2. Změny počtu T-lymfocytů a NK buněk

Buněčnou část specifické imunity reprezentují T-lymfocyty (T-ly), které podléhají u nemocných s CLL celé řadě změn – mění se jejich absolutní počty i relativní zastoupení jednotlivých subsetů a zároveň dochází k funkčním změnám. Celkový počet T-ly se zvyšuje. Ve studii Palmer et al. mělo zvýšený celkový počet T-ly (> 2 x 10⁹/l) 54% nemocných, ve studii Gonzalez-Rodriguez et al. 51% nemocných (zde byla horní mez normy 1.787 x 10⁹/l) (53, 54). Zvýšení počtu T-ly jde zejména na vrub CD8⁺ buněk, což vede k obrácení fyziologického poměru mezi CD4⁺ a CD8⁺ lymfocyty (54, 55). Absolutní počet CD4⁺ lymfocytů se ve srovnání se zdravými jedinci také zvyšuje, ale ne tak výrazně jako v případě CD8⁺.

Fyziologicky prochází CD4⁺ a CD8⁺ T-ly vývojem od naivních buněk (charakterizovaných expresí CCR7, CD45RA a negativitou CD45RO), přes centrální paměťové T-ly (TCM; CCR7⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁻), které se dále diferencují v efektorové paměťové T-ly (TEM; CCR7⁻, CD45RO⁺, CD45RA⁻) a nakonec v terminálně diferencované efektorové T-ly (TEMRA; CCR7⁻, CD45RO⁻, CD45RA⁺) (56, 57). Ve studii, která se zastoupením jednotlivých buněčných populací u nemocných s neléčenou CLL zabývala, měli pacienti s inverzí poměru CD4⁺ a CD8⁺ v rámci CD4⁺ subsetu vyšší podíl TEM a TEMRA lymfocytů na úkor naivních, a v rámci CD8⁺ subsetu vyšší podíl TEMRA lymfocytů na úkor naivních T-ly a TCM (55). U nemocných bez inverze poměru CD4⁺ a CD8⁺ byl patrný pouze vzestup TEMRA v rámci CD4⁺ a pokles naivních T-ly v rámci CD8⁺ buněk. Pacienti se změnou poměru CD4⁺ a CD8⁺ T-ly měli v uvedené studii kratší období přežití bez progresu (progression free survival, PFS), TTFT i zdvojevací čas lymfocytů. Naopak nebyla pozorována asociace s vyšší expresí CD38, ZAP70, mutačním stavem IGHV nebo stadiem CLL v době diagnózy. Wu et al. také pozorovali vztah inverze poměru CD4⁺ a CD8⁺ s kratším TTFT a navíc i stadiem dle Bineta a kratším OS (58). V další práci byla popsána souvislost expanze CD4⁺

TEM a CD8⁺ TEMRA subsetů T-ly s prognosticky nepříznivými chromozomálními aberacemi (delece 11q, nebo 17p), nemutovanými IGHV, potřebou léčby a stadiem onemocnění dle Bineta (59). Kratší OS bylo popsáno i u nemocných s nižším poměrem CD4⁺, respektive CD8⁺ T-ly k počtu CLL buněk, zatímco samotné absolutní počty CLL buněk, CD4⁺ nebo CD8⁺ T-ly vliv na OS v této studii neměly (54). Konečně ve studii Gonnorda et al. měli pacienti progredující k léčbě do 6 měsíců od vyšetření a dále také ti s nemutovanými IGHV geny a stadiem Binet B / C větší zastoupení TEM a naopak méně TCM v rámci CD8⁺ T-ly (60).

Zásadní roli v patogenezi CLL hrají mimo jiné také regulační T-ly (T-reg). Ty za fyziologických podmínek brání nadměrnému poškození vlastních tkání v průběhu zánětu a rozvoji autoimunitních chorob. U CLL byl opakovaně popsán zvýšený absolutní počet T-reg ve srovnání se zdravými kontrolami i zvýšený relativní počet v poměru k ostatním T-ly a to zejména u pokročilejších stádií choroby, nebo u nemocných indikovaných k léčbě (61-65). V jedné ze studií byl počet T-reg v multivariátní analýze nezávislým nepříznivým rizikovým faktorem stran progresu k léčbě (66). Specifickým subsetem T-ly jsou NKT buňky – T-ly s vlastnostmi NK buněk (NK – natural killer, přirození zabíječi). Mají rysy přirozené i adaptivní imunity, schopnost lýzy cílové buňky i regulační funkce, tedy schopnost produkce cytokinů. U nemocných s progredující CLL indikovanou k léčbě byl ve srovnání s nemocnými bez známek aktivity choroby a se zdravými kontrolami pozorován snížený počet NKT buněk (67).

V časných stádiích CLL je popisován zvýšený celkový počet NK buněk (68, 69). Toto zvýšení počtu jde však zejména na vrub nezralých a funkčně nekompetentních NK buněk, zatímco subset zralých NK buněk s cytolytickou aktivitou je potlačen (70). Přesto Wang et al. popsali souvislost nižšího počtu NK buněk s kratším OS a vyšším výskytem nepříznivých prognostických znaků (mutace *TP53*, nemutované IGHV, vyšší $\beta 2$ mikroglobulin, vyšší exprese CD38 a další) (71). Byl také popsán kratší TTFT u nemocných s nižším poměrem NK buněk ke klonálním B-ly (53).

Režimy CHIT kombinující monoklonální protilátky, alkylační cytostatika a purinová analoga vedou k hluboké imunosupresi a vysoké frekvenci oportunních infekcí (72, 73). Po podání FCR byla pozorována hluboká deplece CD4⁺ a v menší míře i CD8⁺ a NK buněk (74-76). Samotný fludarabin vede také k depleci T-reg, což může vést k lepší kontrole onemocnění imunitním systémem a přispívat k protinádorovému účinku této léčby (77). Vlivem FCR, zejména fludarabinu se mění i zastoupení funkčních subsetů T-ly – dochází k depleci naivních T-ly a zvýšení podílu paměťových buněk (76, 78). Alkylační cytostatikum cyklofosamid vykazuje mimo jiné podobné lymfodepleční účinky jako fludarabin včetně změny poměru mezi CD4⁺ a CD8⁺ buňkami (79). Stejně jako fludarabin vede také k redukcí počtu T-reg, přičemž tento účinek je závislý na dávkovacím schématu (80). Dat ohledně poklesu lymfocytů po léčbě BR je k dispozici poměrně hodně, avšak většina prací se netýká specificky CLL, ale pacientů s indolentními lymfomy (45, 81-85). Tyto studie ukazují, že obnova počtu T-ly po bendamustinu může být ještě pomalejší, než po fludarabinu – počty CD4⁺ buněk klesají až pod $0,2 \times 10^9/l$ a zůstávají takto nízké až 2 roky po zahájení léčby. CD8⁺ a NK buňky jsou ovlivněny méně a obnovují se rychleji. Data o změnách funkčních subsetů (naivních T-ly, TCM, TEM, TEMRA), nebo T-reg po léčbě BR zatím prakticky chybí. Pouze dvě studie byly publikovány na téma změn počtu T-ly po chlorambucilu a ukazují, že i toto cytostatikum může vést k depleci CD4⁺ buněk i dalších populací (86, 87). Léčba ibrutinibem vedla ve studii RESONATE-2 k poklesu počtu celkových T-ly i většiny subpopulací, včetně T-reg a NKT buněk, ale byly zachovány naivní T-ly a NK buňky (87).

5. Cíle disertační práce

Cílem této práce bylo posoudit, jak se liší parametry buněčné a humorální imunity mezi dosud neléčenými nemocnými s indolentní, k léčbě neindikovanou CLL, a progredující, k léčbě indikovanou CLL. Obě skupiny byly také porovnány se zdravými kontrolami. Dále byly posuzovány změny vyšetřovaných parametrů vlivem 1. linie léčby pomocí CHIT. Dalším cílem bylo posoudit, zda zkoumané parametry imunitních funkcí nebo jejich změny po léčbě mají souvislost s frekvencí infekčních komplikací. Byl posuzován i prognostický význam těchto parametrů a souvislost s běžně vyšetřovanými prognostickými ukazateli.

6. Materiál a metodika

Jednalo se o prospektivní unicentrickou observační studii. Zařazování byli pacienti s CLL diagnostikovanou dle IWCLL (International Workshop on CLL) kritérií z roku 2008, sledování a případně léčení na IV. interní hematologické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové od září 2013 do listopadu 2020 (88). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii, studie byla schválena místní etickou komisí a probíhala v souladu s Helsinskou deklarací. Nemocným byly odebírány vzorky periferní krve při vstupu do studie (bez ohledu na to, zda u nich byla choroba diagnostikována recentně, nebo již v minulosti). Jednalo se pouze o dosud neléčené pacienty. V případě, že šlo o nemocné bez indikace k léčbě (s neaktivní, stabilní chorobou), u nichž však časem došlo k progresi onemocnění a léčba byla indikována, byl před zvažovanou léčbou proveden 2. odběr. Část pacientů byla k léčbě indikována již v okamžiku vstupu do studie a 1. odběr krve byl tedy zároveň odběr před léčbou. Všechny odběry před léčbou byly provedeny méně než 2 měsíce před zahájením léčby (obvykle jen několik dnů). U části nemocných byl proveden 2. odběr po ukončení léčby, (respektive již 3. odběr, pokud předtím měli odběr ve stádiu neaktivní choroby). Tento odběr byl prováděn v době hodnocení léčebné odpovědi, v rozmezí 1-3 měsíce po posledním cyklu léčby (obvykle přibližně 2 měsíce). Léčba byla indikována na základě IWCLL 2008 kritérií. Po léčbě byla analyzována pouze data nemocných léčených CHIT, a to konkrétně režimy FCR, BR, O-C1b a R-C1b. Dávkování režimů FCR a BR odpovídá dávkování ve studii CLL10 (11). Dávkování O-C1b odpovídá dávkování ve studii CLL11 a dávkování R-C1b tomu ve studii CLL208 (12, 89). Z běžné lékařské dokumentace v nemocničním informačním systému byla shromážděna další potřebná data o průběhu choroby: krevní obraz a stádium dle Raie v době odběru krve, data o infekčních komplikacích, mutační stav IGHV, přítomnost mutace *TP53* vedoucí k jeho dysfunkci (vyšetřováno Sangerovou sekvenací), data o chromozomálních aberacích (vyšetřováno stimulovaným karyotypem a fluorescenční in situ hybridizací [FISH]) a data o léčebné odpovědi. Dále datum poslední kontroly, případně zahájení následující léčby a úmrtí. Na základě těchto dat pak byly vypočítány TTFT a OS u nemocných s neaktivní chorobou, kteří nebyli léčeni a čas do další léčby (time to next treatment, TTNT) a OS u nemocných s progredující chorobou, indikovaných k léčbě. Tyto intervaly jsou v práci definovány nikoliv jako časy od data diagnózy, ale jako časy od okamžiku odběru krve do příslušné události. Tento způsob dle mého názoru lépe odráží případný vztah těchto časů ke zkoumaným parametrům imunitního systému, které mohly mít v době diagnózy zcela jiné hodnoty (u části pacientů od diagnózy do vstupu do studie uplynulo i několik let).

6.1. Laboratorní metody

Byly měřeny absolutní a relativní počty celkových T-ly, CD4⁺ T-ly, CD8⁺ T-ly, CD4⁺CD8⁺ T-ly, CD4⁻CD8⁻ T-ly, celkových B-ly, klonálních B-ly, polyklonálních B-ly, T-reg, NK buněk a NKT buněk. Dále v rámci CD4⁺ i CD8⁺ kompartmentu absolutní i relativní počty jednotlivých subpopulací, tedy naivních T-ly, TCM, TEM a TEMRA buněk.

Výstupem vyšetření průtokovou cytometrií jsou relativní počty buněčných populací. Relativní počet celkových T-ly, klonálních a polyklonálních B-ly a NK buněk je vyjádřen jako % z celkového počtu lymfocytů a jejich součet je roven 100%. Relativní počet CD4⁺ T-ly, CD8⁺ T-ly, CD4⁺CD8⁺ T-ly, CD4⁻CD8⁻ T-ly a NKT buněk je také vyjádřen jako % z celkového počtu lymfocytů a jejich součet je tedy roven relativnímu počtu celkových T-ly. Relativní počet naivních T-ly, TCM, TEM a TEMRA buněk je vyjádřen jako % z celkového počtu buď CD4⁺, nebo CD8⁺ lymfocytů. Relativní počet T-reg je vyjádřen jako % z celkového počtu CD4⁺ lymfocytů. Absolutní počty všech buněčných populací byly vypočteny vynásobením relativních počtů získaných vyšetřením průtokovou cytometrií počtem leukocytů získaným rutinním vyšetřením krevního obrazu z krve odebrané současně s odběrem pro průtokovou cytometrii.

Sérové koncentrace IgG, podtříd IgG1-4, IgA, podtříd IgA1-2 a IgM byly změřeny imunonefelometricky pomocí kitu immunochemistry system Immage od firmy Beckman Coulter (Miami, FL, USA). U všech pacientů byla dále provedena elektroforéza sérových bílkovin a v případě detekce vrcholu v γ oblasti byla doplněna imunofixace k vyloučení přítomnosti případného paraproteinu. Výsledky koncentrací tříd a podtříd Ig u pacienta, který měl v dané třídě detekován paraprotein, byly z další analýzy vyřazeny.

6.2. Statistické zpracování

Veškeré statistické analýzy byly provedeny v programu MedCalc, verze 20 firmy MedCalc Software Ltd (Mariakerke, Belgium). Shapiro-Wilkův test byl použit k posouzení normality rozložení dat. V případě, že obě srovnávané populace měly normální rozložení dat, byl k jejich srovnání použit nepárový t-test v případě nezávislých vzorků, respektive párový t-test při srovnání párových vzorků (srovnání hodnot před léčbou a po léčbě) a v práci jsou udávány aritmetické průměry dat srovnávaných populací. V případě nenormálního rozložení dat jedné, či obou srovnávaných populací byl k jejich srovnání následně použit Mann-Whitneyův U test v případě nezávislých vzorků, respektive Wilcoxonův test při srovnání párových vzorků a v práci jsou udávány mediány dat srovnávaných populací. Coxův model proporcionálních rizik byl použit k posouzení vlivu jednotlivých parametrů imunitního systému na TTFT, TTNT a OS. U statisticky signifikantních proměnných byla provedena ROC (Receiver Operating Characteristic) analýza k určení takové hodnoty zkoumaného parametru imunity, která by nejlépe umožnila rozdělit danou populaci pacientů na dvě skupiny s odlišným časem TTFT, TTNT, či OS. Časy těchto dvou skupin pak byly srovnány log-rank testem a byly zkonstruovány Kaplan-Meierovy křivky. Všechny hypotézy byly testovány na hladině významnosti 0,05.

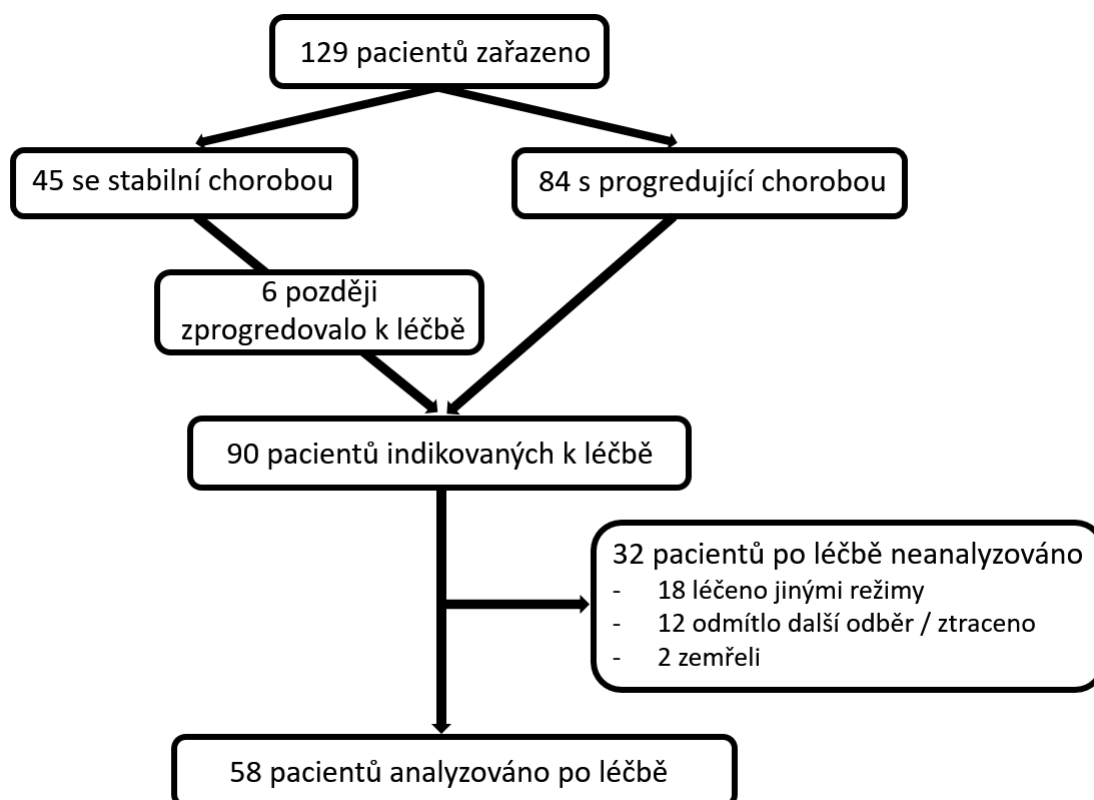
6.3. Charakteristika souboru nemocných

Od září 2013 do května 2019 bylo do studie zařazeno celkem 129 pacientů, kteří byly sledovány do listopadu 2020. Jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1. Jako kontrolní skupina pro vyšetření buněčných populací bylo použito 34 zdravých dárců krve odebraných na transfúzní stanici (medián věku 60 let (rozpětí 43-67), 56% mužů). Celkem 45 nemocných mělo v době odběru neaktivní chorobu neindikovanou k léčbě. Dalších 90 nemocných bylo odebráno v době aktivity choroby (s indikací k léčbě). Opakovaný odběr po léčbě proběhl u 58 nemocných. Schéma odběrů nemocných ve studii ukazuje obrázek 1. Režimem FCR bylo léčeno 20 nemocných, režimem BR 18, režimem O-Clb 9 a režimem R-Clb 11 nemocných. Nikdo z pacientů zařazených do studie nedostával žádnou formu substituce Ig.

Tabulka 1. Charakteristiky jednotlivých kohort pacientů. Data z kohorty "nemocní analyzovaní po léčbě" odpovídají hodnotám naměřeným před zahájením léčby.

Charakteristika	nemocní s neaktivní chorobou	nemocní s progredující chorobou	nemocní analyzovaní po léčbě
Počet	45	90	58
Věk v době odběru, medián (rozpětí)	65 let (34-88)	69 let (43-87)	68 let (43-87)
Muži	24 (53%)	59 (66%)	34 (59%)
Medián sledování od data odběru	49 měsíců	26 měsíců	30 měsíců
Medián času od diagnózy do data odběru (rozpětí)	26 měsíců (4-141)	33 měsíců (0-174)	42 měsíců (1-174)
Modifikované riziko dle Raie v době odběru			
- nízké (stádium 0)	27 (60%)	1 (1%)	1 (2%)
- střední (stádium I-II)	16 (36%)	35 (39%)	23 (40%)
- vysoké (stádium III-IV)	2 (4%)	54 (60%)	34 (59%)
IGHV			
- mutované	25 (56%)	19 (21%)	13 (22%)
- nemutované	10 (22%)	58 (64%)	36 (62%)
- není k dispozici	10 (22%)	13 (14%)	9 (16%)
TP53			
- mutovaný	0	9 (10%)	5 (9%)
- nemutovaný	30 (67%)	67 (74%)	42 (72%)
- není k dispozici	15 (33%)	14 (16%)	11 (19%)
FISH			
- normální	9 (20%)	18 (20%)	15 (26%)
- delece 13q	24 (53%)	26 (29%)	18 (31%)
- trisomie 12	4 (9%)	16 (18%)	9 (16%)
- delece 11q	2 (4%)	16 (18%)	9 (16%)
- delece 17p	0	9 (10%)	2 (3%)
- není k dispozici	6 (13%)	5 (6%)	5 (9%)
mutace TP53 nebo delece 17p	0	13 (14%)	6 (10%)

Obrázek 1. Schéma odběrů nemocných ve studii.



7. Výsledky

7.1. Sérové koncentrace imunoglobulinů

Z analýz byly vyloučeny výsledky koncentrací tříd a podtříd Ig pacientů, kteří měli v dané třídě detekován paraprotein. Frekvenci výskytu hypogamaglobulinémie v celém souboru zobrazuje přehledně tabulka 2.

Tabulka 2. Frekvence výskytu hypogamaglobulinémie. Celkový počet posuzovaných případů je jiný nejen v každé kohortě pacientů, ale vzhledem k vyřazení případů s paraproteinem také pro každou třídu a podtřidu Ig.

Třída / podtřída Ig (dolní hranice normy)	počet nemocných s hypogamaglobulinémií			
	nemocní s neaktivní chorobou	nemocní s progredující chorobou	nemocní před léčbou	nemocní po léčbě
IgG (7,3 g/l)	11 (25%)	44 (55%)	29 (56%)	29 (56%)
IgA (0,8 g/l)	10 (22%)	55 (63%)	36 (65%)	29 (53%)
IgM (0,4 g/l)	13 (29%)	45 (55%)	27 (52%)	30 (58%)
IgG1 (3,6 g/l)	7 (16%)	26 (33%)	18 (36%)	19 (37%)
IgG2 (1,55 g/l)	3 (7%)	26 (26%)	17 (33%)	11 (21%)
IgG3 (0,19 g/l)	4 (9%)	17 (21%)	8 (15%)	6 (12%)
IgG4 (0,08 g/l)	3 (7%)	8 (10%)	4 (8%)	8 (15%)
IgA1 (0,67 g/l)	8 (18%)	51 (59%)	32 (58%)	29 (53%)
IgA2 (0,06 g/l)	2 (4%)	12 (14%)	9 (16%)	2 (4%)

7.1.1. Vliv aktivity choroby a léčby 1. linie na koncentrace imunoglobulinů

Nemocní s progredující chorobou (n=81) měli výrazně nižší koncentrace všech tříd i podtříd Ig, než nemocní s neaktivní chorobou (n=45) – viz tabulka 3. Při srovnání hodnot Ig před a po léčbě (párové vzorky, n=55) byl jedinou statisticky významnou změnou vzestup IgA – viz tabulka 4. Při srovnání nemocných s neaktivní chorobou a pacientů po léčbě byly pak hodnoty všech tříd Ig s výjimkou IgG3 statisticky významně nižší u léčených nemocných – viz tabulka 5.

Samostatně byly analyzovány také párové vzorky nemocných léčených FCR (n=18), BR (n=17) a režimy s chlorambucilem (n=20; 9x O-Clb a 11x R-Clb). Statisticky významné změny byly pozorovány pouze ve skupině léčené FCR, kde léčba vedla k vzestupu IgA (medián 0,52 g/l vs. 0,58 g/l; p=0,018), IgG2 (medián 1,67 g/l vs. 1,78 g/l; p=0,047) a IgA1 (medián 0,44 g/l vs. 0,49 g/l, p=0,048). Změny po režimu BR a chlorambucilových režimech nedosáhly statistické významnosti.

Tabulka 3. Srovnání nemocných s neaktivní a progredující chorobou. Kvantity Ig jsou vyjádřeny jako mediány souboru v g/l.

Třída /podtřída Ig	nemocní s neaktivní chorobou	nemocní s progredující chorobou	p-hodnota
IgG	9,86	6,96	0,0001
IgA	1,53	0,63	<0,0001
IgM	0,57	0,36	0,0035
IgG1	5,63	4,22	0,0036
IgG2	2,85	1,76	<0,0001
IgG3	0,43	0,28	0,021
IgG4	0,31	0,17	0,0016
IgA1	1,3	0,55	<0,0001
IgA2	0,3	0,18	0,0001

Tabulka 4. Srovnání nemocných před léčbou a po léčbě. Kvantity Ig jsou vyjádřeny jako mediány souboru v g/l.

Třída /podtřída Ig	nemocní před léčbou	nemocní po léčbě	p-hodnota
IgG	7,12	6,83	0,37
IgA	0,59	0,74	0,0031
IgM	0,39	0,36	0,25
IgG1	4,09	4,2	0,46
IgG2	1,72	1,97	0,1
IgG3	0,3	0,39	0,12
IgG4	0,18	0,16	0,54
IgA1	0,54	0,65	0,14
IgA2	0,13	0,19	0,13

Tabulka 5. Srovnání nemocných s neaktivní chorobou a po léčbě. Kvantity Ig jsou vyjádřeny jako mediány souboru v g/l.

Třída /podtřída Ig	nemocní s neaktivní chorobou	nemocní po léčbě	p-hodnota
IgG	9,86	6,61	0,0005
IgA	1,53	0,74	0,0001
IgM	0,57	0,32	0,0021
IgG1	5,63	4,13	0,0026
IgG2	2,85	1,97	0,0008
IgG3	0,43	0,38	0,27
IgG4	0,31	0,16	0,0018
IgA1	1,3	0,58	0,0005
IgA2	0,3	0,19	0,0025

7.1.2. Souvislost koncentrací imunoglobulinů a infekčních komplikací

Byly srovnány koncentrace Ig nemocných s neaktivní chorobou, kteří prodělali (n=22) a neprodělali (n=23) infekční komplikaci v období 3 let před odběrem krve k vyšetření. V koncentracích Ig nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Obdobně byly srovnány koncentrace Ig nemocných s progredující chorobou, kteří prodělali (n=29) vs. neprodělali (n=58) infekční komplikaci v období 3 let před odběrem krve k vyšetření. Vzhledem k tomu, že 9 pacientů mělo infekci vícekrát, bylo zaznamenáno celkem 48 infekčních epizod. Ani zde nebyl mezi nemocnými s a bez infekce pozorován statisticky významný rozdíl v koncentracích Ig.

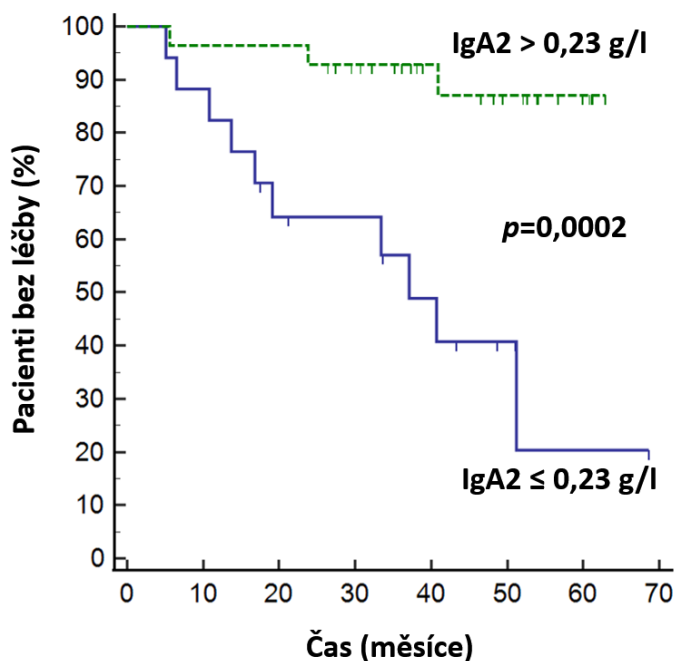
7.1.3. Prognostický význam sérových koncentrací imunoglobulinů

Ze 45 nemocných s neaktivní chorobou došlo k progresi s nutností k léčbě během sledování u 12 z nich. TTFT, resp. přežití bez léčby ve třech letech bylo 79 %. Žádná z koncentrací Ig neměla statisticky významný vliv na TTFT, nicméně v případě IgA2 zde byl jasně patrný trend k rychlejší progresi k léčbě u nemocných s nižší koncentrací (p=0,056). ROC analýzou byla jako nejlepší cut-off hodnota k rozdělení kohorty na skupiny s rozdílným TTFF určena kvantita IgA2 0,23 g/l. Rozdíl v přežití bez léčby na základě tohoto rozdělení ukazuje obrázek 2. OS u nemocných s neaktivní chorobou nebylo analyzováno, protože v průběhu sledování zemřeli pouze 3 z nich.

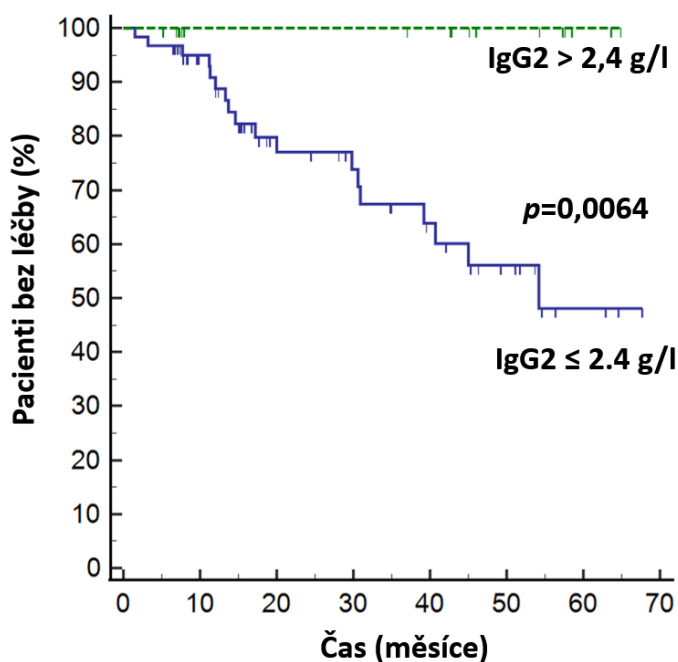
Z 87 nemocných s progredující chorobou jich zemřelo v průběhu sledování 18, OS ve třech letech bylo 78 %. Nižší koncentrace IgG2 zde byla spojena s kratším OS (p=0,043). ROC analýzou byla jako nejlepší cut-off hodnota k rozdělení kohorty na skupiny s rozdílným OS určena kvantita IgG2 2,4 g/l. Rozdíl v OS na základě tohoto rozdělení ukazuje obrázek 3. Souvislost koncentrací Ig a TTNT této kohorty nebyla zjištěna.

Žádná souvislost nebyla pozorována ani mezi koncentracemi Ig a OS, nebo TTNT u 55 nemocných analyzovaných před i po léčbě.

Obrázek 2. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s IgA2 \leq 0,23 g/l a IgA2 $>$ 0,23 g/l. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl ($p=0,0002$).



Obrázek 3. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující OS nemocných s progredující chorobou s IgG2 \leq 2,4 g/l a IgG2 $>$ 2,4 g/l. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl ($p=0,0064$).



7.1.4. Souvislost sérových koncentrací imunoglobulinů a prognostických ukazatelů

Byly porovnány koncentrace Ig mezi podskupinami pacientů definovanými v rámci výše uvedených kohort (neaktivní a progredující choroba) na základě stádia dle Raie a přítomnosti či nepřítomnosti hlavních nepříznivých prognostických ukazatelů. V kohortě nemocných s neaktivní chorobou byly porovnány koncentrace Ig nemocných s mutovanými a nemutovanými IGHV. Statisticky významné rozdíly nebyly zjištěny. Ostatní nepříznivé prognostické ukazatele se v této kohortě vyskytovaly velmi vzácně (pouze 2 nemocní měli del 11q a další 2 stádium III-IV dle Raie), takže nebyly analyzovány.

V kohortě nemocných s progredující chorobou měli pacienti s nemutovanými IGHV vyšší koncentrace IgG (medián 7,39 vs. 5,09 g/l; $p=0,0049$), IgM (medián 0,47 vs. 0,16 g/l; $p=0,0006$), a IgG1 (medián 4,78 vs. 3,38 g/l; $p=0,012$). Dále pacienti s mutací *TP53* a / nebo del 17p měli vyšší koncentrace IgA (medián 0,87 vs. 0,56 g/l; $p=0,0093$), a IgA1 (medián 0,81 vs. 0,47 g/l; $p=0,01$). Pacienti s del 17p a / nebo del 11q v rámci kohorty progredujících nemocných měli vyšší koncentrace IgG (medián 7,42 vs. 6,54 g/l; $p=0,04$), IgM (medián 0,53 vs. 0,28 g/l; $p=0,019$), IgG1 (medián 4,82 vs. 3,92 g/l; $p=0,031$) a IgG3 (medián 0,4 vs. 0,26 g/l; $p=0,006$). Žádný rozdíl v koncentracích Ig nebyl pozorován mezi pacienty s progredující chorobou rozdělenými do podskupin na základě stádia dle Raie (0-II vs. III-IV).

7.2. Buněčné populace

Z celkového počtu progredujících nemocných ve studii bylo vyšetření buněčných populací k dispozici u 80 nemocných (resp. 86 po započtení nemocných odebraných i v době neaktivní choroby). Odběr buněčných populací před i po léčbě byl k dispozici u 55 nemocných. Mimo to se jednalo o stejné nemocné jako při vyšetření koncentrací Ig (viz tabulka 1 a obrázek 1).

7.2.1. Poměry zastoupení buněčných populací a jejich prognostický význam

U nemocných i kontrol byly vypočítány poměry absolutního počtu $CD4^+$ T-ly k absolutnímu počtu $CD8^+$ T-ly a také poměry absolutního počtu $CD4^+$ T-ly, $CD8^+$ T-ly, celkových T-ly, NK a NKT buněk k absolutnímu počtu klonálních B-ly. Výsledné poměry pak byly srovnány mezi jednotlivými kohortami nemocných. Medián poměrů $CD4^+ : CD8^+$ T-ly zdravých kontrol byl 1,99 (rozmezí 1,31-3,01), což nebylo statisticky významně odlišné od nemocných s neaktivní chorobou (medián poměrů 1,85, rozmezí 0,65-8,64; $p=0,48$), ani od nemocných s progredující chorobou (medián poměrů 1,67, rozmezí 0,11-7,64; $p=0,13$). U tohoto poměru nebyl ani statisticky významný rozdíl při srovnání pacientů s neaktivní a progredující chorobou mezi sebou ($p=0,64$). Po léčbě poklesl medián poměrů $CD4^+ : CD8^+$ T-ly na 0,73 (rozmezí 0,17-8,63), což je statisticky významně méně než u kontrolního souboru i u nemocných s neaktivní chorobou (v obou případech $p<0,0001$). Pokles tohoto poměru odráží poměrně výraznější depleci $CD4^+$ ve srovnání s $CD8^+$ buňkami v důsledku léčby. Při srovnání párových vzorků před a po léčbě byl pokles obdobně výrazný (před léčbou medián poměrů 1,87, rozmezí 0,6-7,2, po léčbě 0,73, rozmezí 0,17-8,63; $p<0,0001$).

Co se týče poměrů mezi absolutními počty $CD4^+$ T-ly, $CD8^+$ T-ly, celkových T-ly, NK a NKT buněk a absolutním počtem klonálních B-ly, byly provedeny pouze porovnání mezi nemocnými s aktivní a progredující chorobou – kontroly klonální B-ly nemají a u nemocných po léčbě byla jejich populace v drtivé většině případů téměř nulová. U všech těchto srovnání pak byl zjištěn statisticky významně vyšší medián poměrů u nemocných s neaktivní chorobou. Přesné hodnoty mediánů i rozpětí poměrů a p-hodnoty srovnání ukazuje tabulka 6.

Dále byl analyzován případný vztah uvedených poměrů k TTFT nemocných s neaktivní chorobou a k OS a TTNT nemocných s progredující chorobou. OS nemocných s neaktivní chorobou nebylo hodnoceno, protože v průběhu sledování zemřeli pouze 3 z nich. Jediný poměr, u něhož byla prokázána souvislost s některým z hodnocených časů, byl poměr absolutních počtů NKT buněk a klonálních B-ly. Zde byl u nemocných s progredující chorobou nižší poměr spojen s kratším OS ($p=0,043$).

Tabulka 6. hodnoty mediánů i rozpětí poměrů jednotlivých buněčných populací a p-hodnoty srovnání mezi nemocnými s neaktivní a progredující chorobou.

Poměr	nemocní s neaktivní chorobou; medián (rozmezí)	nemocní s progredující chorobou; medián (rozmezí)	p-hodnota
CD4 ⁺ : CD8 ⁺	1,85 (0,65-8,64)	1,67 (0,11-7,64)	0,64
CD4 ⁺ : klonální B-ly	0,052 (0,007-0,68)	0,018 (0,004-75,08)	0,0001
CD8 ⁺ : klonální B-ly	0,03 (0,003-0,29)	0,012 (0,001-32,38)	0,0008
celkové T-ly : klonální B-ly	0,086 (0,017-1,05)	0,035 (0,005-114,15)	0,0003
NK buňky : klonální B-ly	0,029 (0,0013-0,2)	0,006 (0-49,17)	<0,0001
NKT buňky : klonální B-ly	0,005 (0,001-0,19)	0,002 (0-0,069)	0,022

7.2.2. Změny jednotlivých buněčných populací při progresi onemocnění

Pacienti s neaktivní chorobou měli ve srovnání s kontrolami statisticky významně nižší relativní počty všech hlavních buněčných populací, tedy celkových T-ly, polyklonálních B-ly, NK buněk, CD4⁺ T-ly, CD8⁺ T-ly, CD4⁺CD8⁺ T-ly, CD4⁺CD8⁻ T-ly i NKT buněk, což bylo dáno přítomností klonálních B-ly u nemocných – viz tabulka 7. Relativní počty uvedených populací jsou totiž vyjádřeny jako % z celkového počtu lymfocytů a jsou tedy počtem klonálních B-ly významně ovlivněny. Výjimkou je relativní počet T-reg, který je vyjádřen jako % z celkového počtu CD4⁺ buněk, a není tak klonálními B-ly ovlivněn. Zde byl relativní počet buněk vyšší u nemocných, než u kontrol. Absolutní počty hlavních buněčných populací s výjimkou CD4⁺CD8⁺ T-ly a polyklonálních B-ly byly u nemocných s neaktivní chorobou naopak statisticky významně vyšší, než u kontrol. Co se týče funkčních subpopulací, měli nemocní s neaktivní chorobou ve srovnání s kontrolami statisticky významně vyšší relativní počet CD4⁺ TCM a absolutní počty CD4⁺ TCM, CD8⁺ TCM a CD8⁺ TEMRA. Změny v poměrech funkčních subpopulací shrnuje obrázek 4.

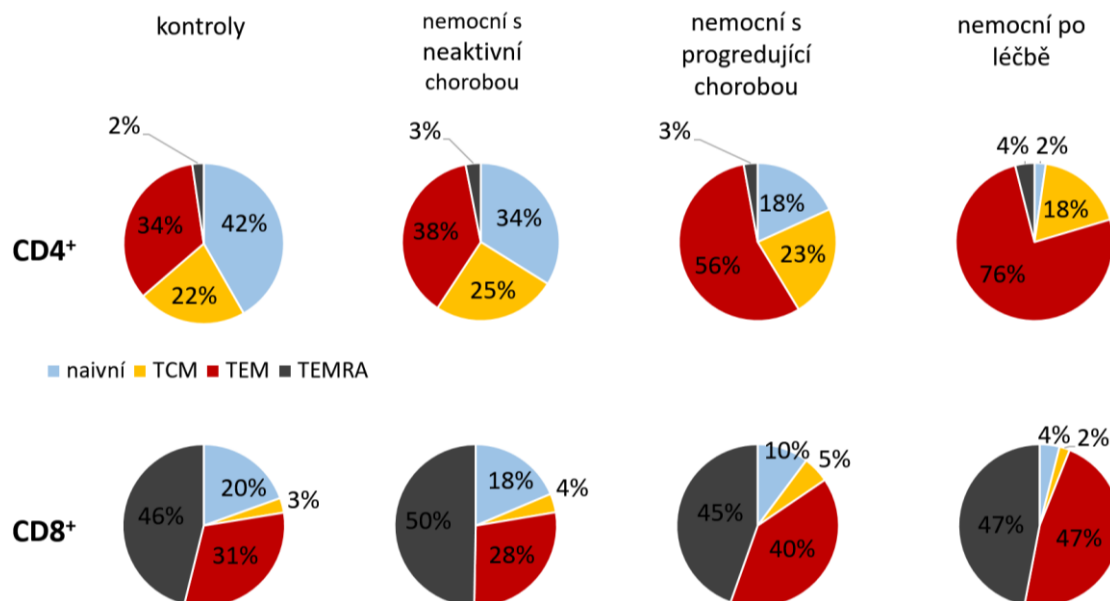
Při srovnání absolutních i relativních počtů hlavních buněčných populací nemocných s progredující chorobou ($n=86$) a kontrol byly patrné obdobné rozdíly jako mezi nemocnými s neaktivní chorobou a kontrolami, byly ale ještě výraznější – viz tabulka 8. Stran funkčních subpopulací byly opět patrné obdobné rozdíly jako mezi kontrolami a nemocnými s neaktivní chorobou, navíc však měli nemocní s progredující chorobou také vyšší absolutní počty CD4⁺ TEM, CD4⁺ TEMRA a CD8⁺ TEM, takže pouze počet naivních buněk zůstal srovnatelný jako u kontrol. Relativní počty naivních buněk pak byly jak v CD4⁺ tak v CD8⁺ kompartmentu u nemocných s progredující chorobou statisticky významně nižší, než u kontrol, relativní počty CD4⁺ TEM a CD8⁺ TCM zase vyšší – viz tabulka 8 a obrázek 4.

Tabulka 7. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými s neaktivní chorobou a kontrolami. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou.

Buněčná populace	nemocní s neaktivní chorobou		kontroly		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	2,17	7,8	1,38	73,25	0,0004	<0,0001
CD4 ⁺ T-ly	1,08	4,54	0,88	46,28	0,034	<0,0001
CD8 ⁺ T-ly	0,72	2,5	0,44	21,96	0,0013	<0,0001
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,013	0,08	0,0095	0,51	0,12	<0,0001
CD4 ⁻ CD8 ⁻ T-ly	0,089	0,4	0,046	1,99	0,0034	<0,0001
celkové B-ly	15,9	89,7	0,23	11,25	<0,0001	<0,0001
polyklonální B-ly	0,048	0,18	0,23	11,25	<0,0001	<0,0001
NKT buňky	0,15	0,5	0,068	3,62	0,021	<0,0001
NK buňky	0,5	2,38	0,29	15,02	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ naivní	0,36	35,43	0,38	38,87	0,88	0,46
CD4 ⁺ TCM	0,27	25,98	0,2	18,09	0,034	0,013
CD4 ⁺ TEM	0,4	34,3	0,31	39,78	0,62	0,24
CD4 ⁺ TEMRA	0,033	2,4	0,021	1,94	0,42	0,86
CD8 ⁺ naivní	0,12	16,7	0,093	12,69	0,3	0,69
CD8 ⁺ TCM	0,024	3,28	0,014	2,24	0,027	0,053
CD8 ⁺ TEM	0,18	27,73	0,15	33,46	0,2	0,08
CD8 ⁺ TEMRA	0,32	48,39	0,22	43,67	0,034	0,34
T-reg	0,084	7,28	0,036	5,09	<0,0001	0,0031

Srovnání byli také pacienti s neaktivní (n=45) a progredující chorobou (n=80) mezi sebou. Výsledky tohoto srovnání shrnuje tabulka 9 a obrázek 4. Progredující nemocní měli vyšší absolutní počet buněk ve všech hlavních populacích kromě polyklonálních B-ly, CD4⁺CD8⁺T-ly, NK a NKT buněk. Relativní počty byly naopak u progredujících pacientů nižší kvůli vyššímu počtu klonálních B-ly. Výjimkou byly opět T-reg, jejichž zastoupení v rámci CD4⁺T-ly bylo u progredující choroby vyšší. Nemocní s progredující chorobou měli dále statisticky významně vyšší absolutní počty CD4⁺ TCM, CD4⁺ TEM, CD8⁺ TCM, CD8⁺ TEM a CD8⁺ TEMRA. Relativní počty naivních CD4⁺ i CD8⁺ buněk byly u progredující choroby významně nižší, zatímco podíl CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEM naopak vyšší, než u nemocných s neaktivní chorobou. Také relativní počet CD8⁺ TEMRA byl navzdory jejich vyššímu absolutnímu počtu u progredujících nemocných nižší a to v důsledku relativně významnějšího vzestupu absolutního počtu CD8⁺ TCM a CD8⁺ TEM ve srovnání s neaktivní chorobou. Přehled srovnání funkčních subsetů mezi jednotlivými kohortami pacientů ukazuje tabulka 10.

Obrázek 4. Koláčové grafy zobrazující poměry jednotlivých funkčních subsetů buněk v jednotlivých kohortách pacientů a u kontrol. % uvedená v grafech jsou vypočítána jako medián z absolutních počtů buněk.



Tabulka 8. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými s progredující chorobou a kontrolami. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou.

Buněčná populace	nemocní s progredující chorobou		kontroly		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	3,53	3,36	1,38	73,25	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ T-ly	2	1,69	0,84	44,92	<0,0001	<0,0001
CD8 ⁺ T-ly	1,27	1,13	0,44	21,96	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,03	0,04	0,01	0,51	0,011	<0,0001
CD4 ⁻ CD8 ⁻ T-ly	0,15	0,14	0,05	1,99	0,0001	<0,0001
celkové B-ly	125,21	95,92	0,23	11,25	<0,0001	<0,0001
polyklonální B-ly	0,06	0,06	0,23	11,25	<0,0001	<0,0001
NKT buňky	0,17	0,19	0,07	3,62	0,0007	0,0003
NK buňky	0,6	0,6	0,29	15,02	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ naivní	0,28	15,5	0,38	40,03	0,3	<0,0001
CD4 ⁺ TCM	0,38	21,46	0,2	16,08	0,0037	0,2
CD4 ⁺ TEM	0,96	51,3	0,31	39,78	0,0001	0,03
CD4 ⁺ TEMRA	0,047	2,38	0,021	1,94	0,039	0,78
CD8 ⁺ naivní	0,11	9,92	0,093	12,69	0,32	0,046
CD8 ⁺ TCM	0,056	5,22	0,014	2,24	0,0002	0,0036
CD8 ⁺ TEM	0,44	38,95	0,15	33,46	<0,0001	0,14
CD8 ⁺ TEMRA	0,48	41,83	0,22	43,67	0,0012	0,69
T-reg	0,19	10,44	0,036	5,01	<0,0001	0,0001

Tabulka 9. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými s neaktivní a progredující chorobou. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou.

Buněčná populace	nemocní s neaktivní chorobou		nemocní s progredující chorobou		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	2,17	7,8	3,62	3,36	<0,0001	0,0004
CD4 ⁺ T-ly	1,08	4,54	2,09	1,69	<0,0001	0,0002
CD8 ⁺ T-ly	0,72	2,5	1,3	1,095	0,0001	0,001
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,013	0,08	0,03	0,04	0,12	0,016
CD4 ⁻ CD8 ⁻ T-ly	0,089	0,4	0,15	0,13	0,034	0,0016
celkové B-ly	15,93	89,7	125,21	95,92	<0,0001	0,0001
klonální B-ly	15,82	89,56	125,1	95,78	<0,0001	0,0001
polyklonální B-ly	0,048	0,18	0,06	0,055	0,33	0,0051
NKT buňky	0,15	0,5	0,17	0,18	0,46	0,012
NK buňky	0,5	2,38	0,6	0,56	0,44	<0,0001
CD4 ⁺ naivní	0,36	35,62	0,3	15,6	0,13	<0,0001
CD4 ⁺ TCM	0,27	24,54	0,38	21,62	0,04	0,47
CD4 ⁺ TEM	0,4	34,3	0,92	49,96	<0,0001	0,0001
CD4 ⁺ TEMRA	0,033	2,4	0,047	2,38	0,082	0,84
CD8 ⁺ naivní	0,12	16,7	0,11	10,15	0,78	0,0005
CD8 ⁺ TCM	0,024	3,28	0,057	5,24	0,0011	0,17
CD8 ⁺ TEM	0,18	27,73	0,43	38,58	<0,0001	<0,0001
CD8 ⁺ TEMRA	0,32	48,39	0,48	41,69	0,025	0,047
T-reg	0,084	7,28	0,2	10,44	0,0003	0,0018

Tabulka 10. Přehled srovnání funkčních subpopulací mezi jednotlivými kohortami pacientů. ~ symbolizuje, že mezi skupinami není statisticky významný rozdíl. ↑ a ↓ symbolizuje, že kohorta uvedená v levém sloupci na 1. místě má statisticky významně vyšší absolutní, nebo relativní počet (%) příslušných buněk, než kohorta uvedená na 2. místě.

Kohorta pacientů		CD4 ⁺ kompartment				CD8 ⁺ kompartment			
		naivní	TCM	TEM	TEMRA	naivní	TCM	TEM	TEMRA
neaktivní vs. kontroly	počet	~	↑	~	~	~	↑	~	↑
	%	~	↑	~	~	~	~	~	~
progredující vs. kontroly	počet	~	↑	↑	↑	~	↑	↑	↑
	%	↓	~	↑	~	↓	↑	~	~
progredující vs. neaktivní	počet	~	↑	↑	~	~	↑	↑	↑
	%	↓	~	↑	~	↓	~	↑	↓
před vs. po léčbě	počet	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	%	↑	↑	↓	~	↑	↑	↓	~
neaktivní vs. po léčbě	počet	↑	↑	~	↑	↑	↑	~	↑
	%	↑	↑	↓	~	↑	↑	↓	~
kontroly vs. po léčbě	počet	↑	↑	~	↑	↑	~	~	~
	%	↑	~	↓	~	↑	~	↓	~

7.2.3. Změny buněčných populací v důsledku léčby 1. linie.

Za účelem posouzení efektu léčby 1. linie pomocí CHIT byly analyzovány párové vzorky z odběrů před a po léčbě u 55 nemocných. Výsledky shrnuje tabulka 11. Absolutní počty všech hodnocených buněčných populací statisticky významně poklesly. Relativní zastoupení funkčních subpopulací se změnilo ve prospěch TEM buněk na úkor naivních a TCM buněk v CD4⁺ i CD8⁺ kompartmentu – viz tabulka 10 a obrázek 4. Relativní počet TEMRA buněk se vlivem léčby statisticky významně nezměnil. Výsledky nemocných po léčbě byly také porovnány s hodnotami nemocných s neaktivní chorobou a s hodnotami zdravých kontrol – viz tabulka 12. Absolutní počty všech analyzovaných populací kromě CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEM poklesly po léčbě pod úroveň pozorovanou u nemocných s neaktivní chorobou. Také ve srovnání s kontrolním souborem, který měl obecně nižší absolutní počty buněk než nemocní s neaktivní chorobou, byly počty buněk po léčbě srovnatelné, nebo dokonce ještě nižší (signifikantně nižší v případě celkových T-ly, CD4⁺ T-ly, CD4⁺CD8⁻ T-ly, polyklonálních B-ly, NKT buněk, naivních CD4⁺, TCM a TEMRA buněk a naivních CD8⁺ buněk). Relativní počet T-reg zůstal po léčbě statisticky významně vyšší, než u kontrol, protože počet ostatních CD4⁺ T-ly poklesl více, než počet T-reg. Pacienti po léčbě měli dále nižší zastoupení CD4⁺ i CD8⁺ naivních a TCM buněk, než pacienti s neaktivní chorobou, a naopak vyšší podíl CD4⁺ i CD8⁺ TEM buněk, než pacienti s neaktivní chorobou i kontroly.

Tabulka 11. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými před a po léčbě. Absolutní počty jsou vyjádřeny v 10⁹/l, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou.

Buněčná populace	nemocní před léčbou		nemocní po léčbě		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	3,53	2,57	0,95	74,95	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ T-ly	2,19	1,56	0,32	26,07	<0,0001	<0,0001
CD8 ⁺ T-ly	1,22	0,85	0,52	38,72	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,03	0,03	0,01	0,52	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ CD8 ⁻ T-ly	0,15	0,12	0,01	1,11	<0,0001	<0,0001
celkové B-ly	175,34	96,77	0	0,05	<0,0001	<0,0001
klonální B-ly	165,94	96,71	0	0	<0,0001	<0,0001
polyklonální B-ly	0,06	0,05	0	0	<0,0001	0,0003
NKT buňky	0,21	0,17	0,03	1,92	<0,0001	<0,0001
NK buňky	0,6	0,48	0,23	16,1	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ naivní	0,27	15,15	0,0064	2,14	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ TCM	0,44	20,15	0,054	14,79	<0,0001	0,0015
CD4 ⁺ TEM	1,05	53,18	0,24	75,84	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ TEMRA	0,045	2,24	0,01	3,045	<0,0001	0,18
CD8 ⁺ naivní	0,11	10,15	0,015	3,19	<0,0001	0,0001
CD8 ⁺ TCM	0,06	4,3	0,0085	2,01	<0,0001	0,0005
CD8 ⁺ TEM	0,44	38,55	0,19	44,38	0,0002	0,0081
CD8 ⁺ TEMRA	0,49	40,57	0,19	39,45	<0,0001	0,16
T-reg	0,22	11,13	0,042	14,98	<0,0001	0,047

Tabulka 12. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými po léčbě a zdravými kontrolami. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou.

Buněčná populace	nemocní po léčbě		kontroly		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	0,95	74,95	1,38	73,25	0,0023	0,59
CD4 ⁺ T-ly	0,32	26,07	0,84	44,92	<0,0001	<0,0001
CD8 ⁺ T-ly	0,52	36,9	0,44	22,8	0,65	0,0023
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,01	0,52	0,01	0,51	0,12	0,65
CD4 ⁻ CD8 ⁻ T-ly	0,01	1,11	0,05	1,99	0,0005	0,0031
celkové B-ly	0	0,05	0,23	11,25	<0,0001	<0,0001
polyklonální B-ly	0	0	0,23	11,25	<0,0001	<0,0001
NKT buňky	0,03	1,78	0,07	3,62	0,0021	0,032
NK buňky	0,23	16,12	0,29	15,012	0,07	0,39
CD4 ⁺ naivní	0,006	2,04	0,38	40,03	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ TCM	0,053	14,76	0,2	16,08	<0,0001	0,2
CD4 ⁺ TEM	0,23	76,16	0,31	40,45	0,065	<0,0001
CD4 ⁺ TEMRA	0,01	3,2	0,021	1,94	0,033	0,53
CD8 ⁺ naivní	0,014	3,16	0,093	12,69	0,0001	<0,0001
CD8 ⁺ TCM	0,0084	1,98	0,014	2,24	0,17	0,73
CD8 ⁺ TEM	0,19	43,61	0,15	33,46	0,4	0,013
CD8 ⁺ TEMRA	0,19	40,29	0,22	41,62	0,93	1
T-reg	0,03	13,16	0,036	5,01	0,65	0,0003

7.2.4. Srovnání vlivu různých léčebných režimů na buněčné populace

Opět byly samostatně analyzovány párové vzorky nemocných léčených FCR (n=17), BR (n=18) a režimy s chlorambucilem (n=20; 9x O-Clb a 11x R-Clb). Změny hlavních buněčných populací byly podobné, jako když byla celá kohorta analyzována dohromady. Ojedinelé rozdíly spočívaly pouze v míře statistické významnosti – při analýze jednotlivých režimů nebyly některé změny statisticky významné pravděpodobně v důsledku malého množství pacientů v jednotlivých souborech. V případě relativního počtu T-reg byl po léčbě BR pozorován statisticky významný vzestup, po FCR a O-Clb / R-Clb nebyly změny statisticky významné. Vzhledem k tomu, že absolutní počet T-reg poklesl po všech typech léčby, je tento rozdíl dán zřejmě důsledkem rozdílné míry poklesu počtu ostatních CD4⁺, kam se T-reg počítají.

Při srovnání vlivu léčby na počty buněk funkčních subsetů vyšlo najevo, že po léčbě FCR a BR statisticky významně klesl absolutní počet CD4⁺ TEMRA, zatímco po léčbě O-Clb / R-Clb nikoliv. Z tohoto důvodu se relativní zastoupení CD4⁺ TEMRA mezi CD4⁺ T-ly po léčbě O-Clb / R-Clb zvýšilo, zatímco po FCR / BR a také v případě celé kohorty léčených nemocných zůstalo nezměněno. Statistické významnosti dále nedosáhl pokles relativního počtu CD4⁺ TCM po léčbě O-Clb / R-Clb. Ostatní změny v CD4⁺ kompartmentu odpovídaly změnám celého souboru léčených pacientů. Změny v CD8⁺ kompartmentu byly také podobné jako u všech léčených nemocných. Statistické významnosti nedosáhl pokles relativního počtu CD8⁺ TCM a absolutního počtu CD8⁺ TEM a TEMRA po léčbě BR a ani vzestup relativního počtu CD8⁺ TEM po žádném typu léčby.

Byla porovnáována také míra změn buněčných populací mezi jednotlivými režimy léčby – při této analýze byl nejdříve spočítán rozdíl (pokles nebo vzestup) absolutního počtu všech buněčných populací před léčbou a po léčbě zvláště pro každého pacienta. Výsledky pak byly srovnány mezi sebou pomocí Mann-Whitneyova testu (FCR vs. BR, FCR vs. O-Clb / R-Clb, BR vs. O-Clb / R-Clb). Při tomto srovnání se efekt léčby na hlavní buněčné populace včetně T-reg mezi jednotlivými režimy nelišil, kromě většího poklesu polyklonálních B-ly po FCR a BR ve srovnání s O-Clb / R-Clb (medián poklesu o $0,053 \times 10^9/l$ po FCR, $0,096 \times 10^9/l$ po BR a $0,021 \times 10^9/l$ po O-Clb / R-Clb; FCR vs. BR $p=0,13$; FCR vs. O-Clb / R-Clb $p=0,034$; BR vs. O-Clb / R-Clb $p=0,0027$).

Také ve vlivu na funkční subsety byl v této analýze mezi režimy pouze jeden statisticky významný rozdíl, a to větší pokles počtu $CD4^+$ TEMRA po FCR ve srovnání s O-Clb / R-Clb (medián poklesu o $0,062 \times 10^9/l$ vs. $0,004 \times 10^9/l$, $p=0,0062$). Mezi režimy FCR a BR a režimy BR a O-Clb / R-Clb nebyly statisticky významné rozdíly.

7.2.5. Souvislost počtů buněk a infekčních komplikací

Stejně jako v případě koncentrací Ig byly porovnávány také parametry buněčné imunity mezi nemocnými, kteří prodělali a neprodělali infekci v období 3 let před odběrem krve do studie. Co se týče pacientů s neaktivní chorobou, infekční komplikaci mělo v tomto období 22 ze 45. Pacienti, kteří infekci prodělali, měli statisticky významně vyšší absolutní počet klonálních B-ly (medián 28,4 vs. $13,32 \times 10^9/l$, $p=0,043$), vyšší relativní počet klonálních B-ly (medián 93,3 vs. 81,5 %, $p=0,046$), nižší relativní počet polyklonálních B-ly (medián 93,3 vs. 81,5 %, $p=0,046$), NK buněk (medián 1,48 vs. 3,1 %, $p=0,049$) a $CD4^+$ T-ly (medián 3,2 vs. 9,29 %, $p=0,033$). Nemocní s infekcemi měli také nižší poměr $CD4^+$ buněk ke klonálním B-ly (medián 0,034 vs. 0,12, $p=0,039$) a NK buněk ke klonálním B-ly (medián 0,016 vs. 0,039, $p=0,04$).

Z nemocných s progredující chorobou jich prodělalo infekční komplikaci v období 3 let před odběrem krve do studie 29 z 86. Jednalo se o 46 infekčních epizod, kdy 8 pacientů mělo více než jednu infekci. Jediné statisticky významné rozdíly mezi nemocnými s progredující chorobou s infekcemi a bez infekcí v anamnéze byly nižší zastoupení naivních $CD4^+$ T-ly (medián 11,99 vs. 18,71 %, $p=0,041$) a vyšší absolutní počet $CD8^+$ TEM (medián 0,54 vs. $0,36 \times 10^9/l$, $p=0,043$) u nemocných s infekcemi. Stejně jako v případě koncentrací Ig, ani zde nebyly vzhledem k nízkému výskytu samostatně analyzovány závažné infekce (viz výše).

7.2.6. Prognostický význam počtů buněk

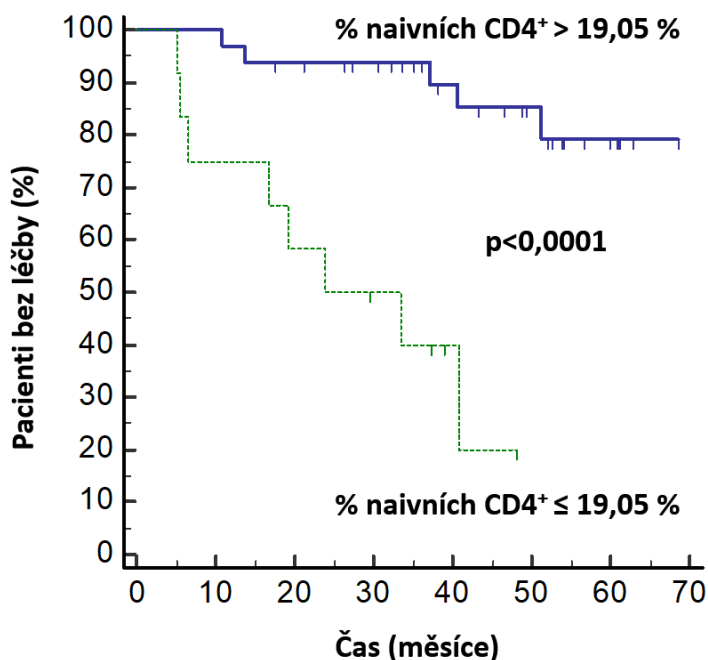
K progresi k léčbě došlo během sledování u 12 ze 45 nemocných s neaktivní chorobou. TTFT, resp. přežití bez léčby ve třech letech bylo 79 %. Vyšší relativní počet naivních $CD4^+$ T-ly ($p=0,0026$) a naivních $CD8^+$ T-ly ($p=0,023$) byly asociovány s delším TTFT, zatímco vyšší absolutní počet $CD4^+$ TCM ($p=0,027$) a vyšší relativní ($p=0,0047$) i absolutní ($p=0,003$) počet $CD4^+$ TEM byly spojeny s kratším TTFT. Vliv relativního počtu naivních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-ly na TTFT ukazují obrázky 5 a 6.

OS u nemocných s neaktivní chorobou nebylo analyzováno, protože v průběhu sledování zemřeli pouze 3 z nich. Žádná souvislost nebyla nalezena mezi analyzovanými parametry a OS progredujících pacientů (v průběhu sledování zemřelo 17 z 86, OS ve třech letech bylo 79%).

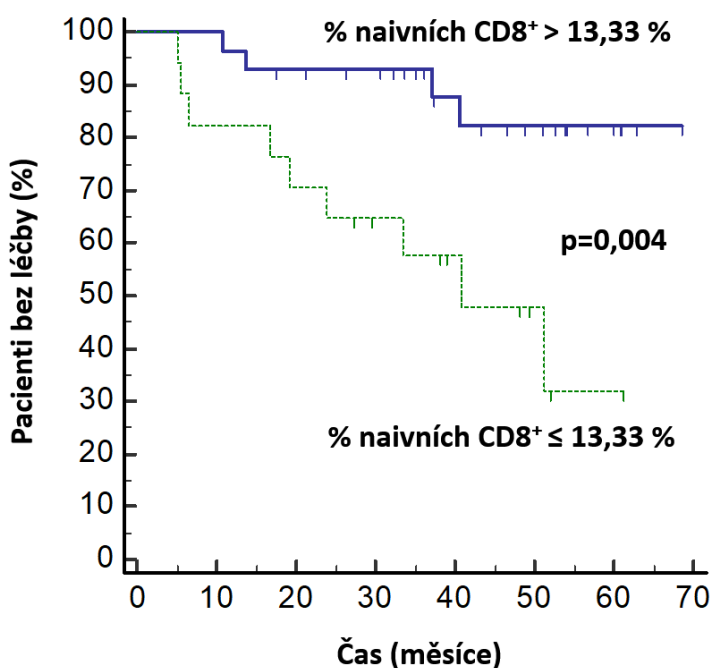
Dále byl zkoumán vliv buněčných populací na OS 56 nemocných léčených CHIT. V průběhu sledování zemřelo 7 z nich (3 nemocní léčení režimem BR a 4 nemocní léčení R-Clb). Statisticky významná souvislost s OS byla zjištěna pouze v případě absolutního počtu $CD4^+$ TCM – vyšší počet byl spojen s kratším OS ($p=0,041$). Ve stejné kohortě byl analyzován i TTNT. Podruhé bylo během sledování léčeno 20 nemocných. S kratším TTNT byl statisticky významně

asociován vyšší absolutní počet T-reg ($p=0,042$) a vyšší absolutní počet $CD4^+$ TCM ($p=0,035$). Počet $CD4^+$ TCM zůstal významný i v multivariantní analýze, nezávisle na počtu T-reg, nebo použitím režimu CHIT ($p=0,024$).

Obrázek 5. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s naivními $CD4^+$ T-ly $> 19,05\%$ a $\leq 19,05\%$. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl ($p<0,0001$).



Obrázek 6. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s naivními $CD8^+$ T-ly $> 13,33\%$ a $\leq 13,33\%$. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl ($p=0,004$).



7.2.7. Souvislost počtů buněk a prognostických ukazatelů

Stejně jako v případě koncentrací Ig byly porovnány i absolutní a relativní počty zkoumaných buněk mezi nemocnými rozdělenými dle stádia dle Raie a přítomnosti nepříznivých prognostických ukazatelů. V kohortě nemocných s neaktivní chorobou měli pacienti s nemutovanými IGHV vyšší absolutní počet CD8⁺ T-ly (medián 1,08 vs. 0,62 x 10⁹/l, p=0,024). Dále byl u nich pozorován nižší relativní počet naivních CD4⁺ T-ly (průměr 21,99 vs. 39,21 %, p=0,011), a naopak vyšší relativní počet CD4⁺ TEM (průměr 52,42 vs. 32,53 %, p=0,0018), vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM (průměr 0,81 vs. 0,41 x 10⁹/l, p=0,0005) a CD8⁺ TEMRA (medián 0,62 vs. 0,26 x 10⁹/l, p=0,018).

V rámci pacientů s progredující chorobou měli ti s nemutovanými IGHV vyšší relativní počet T-reg (průměr 11,17 vs. 7,83 %, p=0,033) a pouze trend k vyššímu relativnímu počtu CD8⁺ TEM (průměr 40,68 vs. 33,55 %, p=0,062).

Pacienti s progredující chorobou a mutací *TP53* měli vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM (medián 1,58 vs. 0,91 x 10⁹/l, p=0,046). Když byly porovnány skupiny s, nebo bez del 17p, a s, nebo bez del 17p / mutace *TP53*, statisticky významné rozdíly nebyly zjištěny. Při porovnání skupin dle přítomnosti del 17p a / nebo del 11q měli pacienti s těmito chromozomálními aberacemi obecně vyšší absolutní i relativní počty celkových a klonálních B-ly a na základě toho nižší relativní počet celkových T-ly a CD8⁺ T-ly. Co se týče funkčních subpopulací, měli pacienti s uvedenými delecemi vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM (medián 1,15 vs. 0,8 x 10⁹/l, p=0,037).

Pacienti s progredující chorobou ve stádiu Rai III-IV měli ve srovnání s těmi ve stádiu Rai 0-II vyšší absolutní i relativní počty celkových a klonálních B-ly a na základě toho nižší relativní počty všech ostatních hlavních buněčných populací. Absolutní počty ostatních hlavních populací (jiných než celkových a klonálních B-ly) se nelišily. Řada rozdílů byla i mezi funkčními subpopulacemi nemocných rozdělených dle stádia choroby: Pacienti ve stádiu III-IV dle Raie měli vyšší relativní i absolutní počet naivních CD4⁺ T-ly a vyšší absolutní počet CD4⁺ TCM (naivní CD4⁺, relativní: medián 16,61 vs. 14,8 %, p=0,03; naivní CD4⁺, absolutní: medián 0,36 vs. 0,17 x 10⁹/l, p=0,0074; CD4⁺ TCM, absolutní: medián 0,54 vs. 0,36 x 10⁹/l, p=0,034). Pokročilejší choroba byla dále spojena s vyšším relativním i absolutním počtem CD8⁺ TCM (CD8⁺ TCM, relativní: medián 5,95 vs. 3,26 %, p=0,008; CD8⁺ TCM, absolutní: medián 0,063 vs. 0,026 x 10⁹/l, p=0,008).

8. Diskuse

8.1. Sérové koncentrace imunoglobulinů

Srovnali jsme koncentrace Ig nemocných s neaktivní chorobou a nemocných indikovaných k léčbě. Druhá skupina měla statisticky významně nižší koncentrace všech tříd i podtříd Ig, což lze interpretovat jako důsledek progresu onemocnění. Nejedná se o překvapivý nález, nicméně pokud je nám známo, žádné podobné srovnání nebylo dosud publikováno.

Studii zabývajících se změnami koncentrací Ig po CHIT je velmi málo. Byl publikován vzestup IgG a IgM po léčbě fludarabinem event. v kombinaci s prednisonem a naopak pokles IgG po léčbě FCR (40, 41). U nemocných s lymfomy se pak v několika studiích prevalence hypogamaglobulinémie buď zvyšovala, nebo se hodnoty Ig významně neměnily (42, 43). Pokles Ig byl popsán také po léčbě BR, event. po bendamustinu s obinutuzumabem ve studiích GAUDI a GALLIUM (44, 45). Ačkoliv je tedy dat specificky pro CLL minimum, obecně se předpokládá, že CHIT může vést k prohloubení hypogamaglobulinémie.

Velká pozornost je v tomto směru v současnosti věnována cílené terapii. Po léčbě ibrutinibem byl již v několika studiích popsán vzestup IgA a s tím potenciálně související pokles výskytu infekcí (47-52).

V naší analýze byl zaznamenán statisticky významný vzestup IgA po podání CHIT (medián koncentrací IgA stoupl z 0,59 g/l na 0,74 g/l, $p=0,0031$). U ostatních tříd a podtříd nedošlo ke statisticky významným změnám. Při samostatné analýze vlivu jednotlivých léčebných režimů byl vzestup Ig pozorován pouze po FCR (konkrétně vzestup IgA, IgA1 a IgG2), zatímco změny po režimu BR a chlorambucilových režimech nedosáhly statistické významnosti. To lze vyložit i tak, že vzestup IgA v celé kohortě léčených nemocných je zejména na vrub pacientů léčených FCR. Počty pacientů ve skupinách rozdělených podle režimu léčby byly ale již velmi nízké, takže výsledky musí být interpretovány s opatrností.

Možné vysvětlení vzestupu IgA po podání CHIT spočívá v celkovém zlepšení imunitních funkcí po potlačení CLL klonu, který je za hypogamaglobulinémii a další imunitní defekty přímo či nepřímo zodpovědný (cytotoxický vliv samotných CLL buněk, nebo autologních NK buněk na plasmocyty, deficit neklonálních B-ly, defekty T-ly) (90-92). Ačkoliv po ibrutinibu byl vzestup IgA popsán opakovaně, ani zde není mechanismus jasný. Jako jedna z možností se jeví zvýšená dostupnost růstových faktorů pro neklonální B-ly a tedy vzestup jejich počtu po eliminaci CLL buněk, dále lepší spolupráce B-ly s $CD4^+$ T-ly v důsledku změn T-ly po ibrutinibu, nebo i specificky posun od Th2 zpět k Th1 imunitní odpovědi v důsledku působení ibrutinibu (49, 87, 93). Ačkoliv Th1 imunitní odpověď je založená spíše než na produkci protilátek na cytotoxických T-ly, bylo prokázáno, že tento posun koreluje se vzestupem koncentrace IgA u ibrutinibem léčených pacientů (93). Je možné, že některé popsané změny nejsou specifické pro ibrutinib, ale mohou být vyvolány jakoukoliv léčbou s kapacitou eliminovat CLL klon. K zodpovězení otázky, co stojí za vzestupem IgA po léčbě ibrutinibem a jak ukazuje naše práce i po CHIT, je zjevně potřeba dalších výzkumů.

Jedním z cílů práce bylo prozkoumat případnou souvislost mezi koncentracemi Ig a frekvencí infekcí. Řada předchozích studií tuto souvislost našla (25, 33, 36-39). V našem souboru nemocných jsme ji však nepozorovali. Vysvětlením může být samozřejmě poměrně malý počet vyšetřených nemocných. Také Andersen et al. nenašli souvislost mezi koncentracemi Ig a výskytem infekcí při analýze dat 159 nemocných s CLL z roku 2016 (29). Když ale o dva roky později publikovali výsledky obdobného výzkumu s rozsáhlejším souborem 1204 pacientů, byla již patrná vyšší frekvence infekcí při deficitu IgA, IgG i IgM v univariantsní analýze a ve třídě IgA i v multivariantsní analýze (33).

Na rozdíl od souvislosti s výskytem infekcí jsme v našem zkoumaném souboru prokázali souvislost mezi kratším OS a nižší koncentrací Ig, konkrétně IgG2 nemocných s progredující chorobou. Jen těsně pak nedosáhla statistické významnosti souvislost mezi nižší koncentrací IgA2 a kratším TTFT nemocných s neaktivní chorobou. Asociace nízkých koncentrací Ig s kratším OS byla pozorována v řadě dalších studií, nejčastěji pro IgA (28-31). Méně často pak pro IgG, nebo IgM (28, 29, 34). Asociace s kratším TTFT byla v jedné studii popsána pro IgG a ve dvou pro IgA (26, 31, 35). Stejně tak byla prokázána souvislost deficitu IgA s kratším TFS (25, 30).

Byla zkoumána souvislost koncentrací Ig a nejdůležitějších prognostických faktorů – stádia dle Raie, mutačního stavu IGHV, mutace *TP53*, del 11q a del 17p. Podobné analýzy jsou v literatuře ojedinělé. Byly popsány snížené koncentrace IgG (Parikh et al.), IgG a IgA (Ishdorj et al.), respektive jakékoliv třídy Ig (Singh et al.) u nemocných ve vyšších stádiích dle Raie (26, 27, 31).

V našem souboru neměli nemocní s progredující chorobou ve stádiu Rai 0-II statisticky významně rozdílné koncentrace Ig ve srovnání s nemocnými ve stádiu III-IV. Nabízí se následující vysvětlení: na rozdíl od citovaných prací jsme pacienty rozdělili na skupinu s neaktivní a progredující chorobou a analýzy jsme prováděli v rámci těchto skupin. Mezi nemocnými s neaktivní chorobou měli všichni kromě dvou časná stadia choroby a tato subanalýza zde tedy nebyla provedena. V rámci pacientů s progredující chorobou lze konstatovat, že i když část měla stádium I či II dle Raie, i u nich byla přítomna nějaká indikace k léčbě, např. masivní lymfadenopatie, a tedy choroba nejspíše podobně aktivní, jako u těch ve stádiu III či IV. Skutečně, když jsme zkusili analyzovat vliv stadia dle Raie u všech pacientů dohromady (s progredující i neaktivní chorobou), s výjimkou IgG1 a IgG3 měli pacienti ve vyšších stádiích nižší koncentrace všech tříd a podtříd Ig. Tuto analýzu však neuvádíme a místo toho předkládáme srovnání pacientů s neaktivní a progredující chorobou mezi sebou. Takové porovnání je v rámci publikované literatury unikátní a zároveň je rozdělení dle indikace k léčbě i "ostřejší," protože se naše skupiny (neaktivní a progredující) liší ve všech třídách a podtřídách Ig včetně IgG1 a IgG3.

Překvapivým zjištěním v našem výzkumu jsou vyšší koncentrace některých tříd a podtříd Ig u progredujících nemocných s nepříznivými prognostickými faktory. Pacienti s nemutovanými IGHV měli vyšší koncentrace IgG, IgG1 a IgM, pacienti s mutací *TP53*, a / nebo del 17p vyšší koncentrace IgA a IgA1 a ti s del 17p a / nebo del 11q vyšší koncentrace IgG, IgG1, IgG3 a IgM. Možným vysvětlením je, že hypogamaglobulinémie nemusí být přímo spojená s agresivitou choroby, ale spíše s délkou jejího trvání. CLL s nepříznivými biologickými rysy progreduje mnohem rychleji a některé změny v imunitním systému včetně hypogamaglobulinémie mohou k plnému rozvinutí potřebovat delší čas. Mauro et al. ani Parikh et al. nepozorovali žádnou souvislost koncentrací Ig s mutačním stavem IGHV, ale ve studii Ishdorja et al. měli nemocní s mutovanými IGHV nižší koncentrace IgM, což odpovídá našim zjištěním (25, 26, 31). Co se týče souvislosti s chromozomálními aberacemi, pouze Parikh et al. popsali nižší IgG u nemocných s tri 12 (nevyšetřovali ale jiné třídy či podtřídy Ig) (26). Mauro et al. neprokázali souvislost s del 11q či del 17p (25). Pokud je nám známo, naše práce je jediná, která zkoumala možný vliv dysfunkce *TP53* na hypogamaglobulinémii. Z výše citovaných studií nebyly informace o mutaci *TP53* k dispozici v žádné z nich a pouze ve dvou byly zahrnuty výsledky FISH vyšetření del 17p. K potvrzení našich výsledků je třeba dalších studií s větším počtem pacientů.

8.2. Buněčné populace

Ve studiích Nunes et al. a Wu et al. byla inverze poměru CD4⁺ k CD8⁺ T-ly spojena s kratším TTFT, PFS i OS (55, 58). V naší analýze neměl tento poměr statisticky významný vliv na TTFT pacientů s neaktivní chorobou, ani TTNT, nebo OS pacientů s progredující chorobou. Tento rozdíl se dá alespoň částečně přičíst na vrub odlišnostem ve studovaných populacích. V naší studii mělo inverzi fyziologického CD4⁺ : CD8⁺ poměru pouze 9 / 45 (20 %) nemocných s neaktivní chorobou a 13 / 86 (15 %) nemocných s progredující chorobou, ve srovnání s 47 % ve studii Nunes et al.. Wu et al. zase analyzovali pacienty s neaktivní i progredující CLL dohromady.

Palmer et al. zjistili, že nižší poměr celkových T-ly a také NK buněk ke klonálním B-ly je u nemocných s nově dg. CLL (83 % bylo ve stádiu 0-I dle Raie) spojen s kratším TTFT (53). Tyto poměry přitom byly silnějším prediktorem rychlé progresy k léčbě, než prostý počet CLL buněk a zároveň samotné počty celkových T-ly či NK buněk nebyly s TTFT asociovány vůbec. Gonzalez-Rodriguez et al. pozorovali souvislost mezi nižším poměrem CD4⁺ i CD8⁺ T-ly ke

klonálním B-ly a kratším OS (54). V naší práci jsme nepozorovali prognostický význam poměrů hlavních buněčných populací ke klonálním B-ly s jedinou výjimkou – pacienti s progredující chorobou a nižším poměrem NKT buněk k CLL buňkám měli statisticky významně kratší OS ($p=0,043$). Prognostický význam NKT buněk dosud popsali pouze v jedné studii, kde měli pacienti s neléčenou CLL a podílem NKT buněk z celkových T-ly $> 5,3$ % významně delší TFS a OS (94). Tyto, stejně jako naše výsledky naznačují, že NKT buňky mohou hrát významnou roli v kontrole maligního klonu.

Při hodnocení dynamiky absolutních a relativních počtů hlavních buněčných populací byl v naší analýze patrný vzorec, kdy nemocní s neaktivní CLL měli vyšší absolutní počty většiny zkoumaných populací, než kontroly a progredující pacienti zase vyšší počty, než ti s neaktivní chorobou. Tyto nálezy jsou kompatibilní s výše citovanými studiemi, kde měli nemocní počty $CD4^+$ T-ly a $CD8^+$ T-ly také zvýšené nad normu, nebo vyšší než kontroly. Změny v poměrech mezi funkčními subpopulacemi byly nejpodrobněji popsány ve studii Nunes et al. a v případě $CD8^+$ T-ly Richese et al. (55, 95). Pokud shrneme nálezy z obou studií, zdá se, že zatímco podíl naivních a TCM T-ly se snižuje, podíl TEM a TEMRa T-ly naopak stoupá, a to jak v $CD4^+$, tak v $CD8^+$ kompartmentu. V dalších studiích byla expanze $CD4^+$ TEM a $CD8^+$ TEM a TEMRA spojena s pokročilou chorobou (59, 60). V práci Rissieka et al. byl vyšší podíl $CD8^+$ TEM a TEMRA buněk spojen s kratším TTFT (96). V naší analýze jsme v $CD4^+$ kompartmentu progredujících nemocných zaznamenali zvýšený absolutní počet TCM, TEM i TEMRA buněk, přičemž počet naivních $CD4^+$ T-ly se nezměnil. Toto se ve smyslu % projevilo jako pokles podílu naivních $CD4^+$ T-ly a vzestup $CD4^+$ TEM, protože jejich absolutní počet se zvýšil nejvýrazněji. Podíl $CD4^+$ TCM a TEMRA na celkových $CD4^+$ T-ly zůstal podobný. V $CD8^+$ kompartmentu jsou ve srovnání s $CD4^+$ populací fyziologicky výrazně více zastoupeny TEMRA buňky. Dynamika změn mezi kontrolami, neaktivní a progredující CLL byla ale jinak obdobná té pozorované v $CD4^+$ kompartmentu. Kromě počtů TCM buněk jsou uvedené nálezy srovnatelné s výsledky Nunes et al. Společným pozorováním je vzestup podílu diferencovanějších populací, zejména TEM a TEMRA, na úkor naivních T-ly. To může limitovat schopnost imunitního systému odpovídat na nové antigenní podněty včetně samotné CLL a tak přispívat k další progresi onemocnění.

CHIT vedla v naší studii k výraznému poklesu absolutních počtů buněk napříč populacemi. Ty se tak vrátily na úroveň srovnatelnou s kontrolami, nebo i níže. V tomto směru tedy CHIT zvrátila efekt progresse onemocnění, tedy vzestup $CD4^+$ T-ly, $CD8^+$ T-ly, $CD4^+CD8^-$ T-ly, NK a NKT buněk. Míra poklesu byla orientačně o něco nižší, než jaká byla publikována v podobných studiích, jde však pouze o nepřímé srovnání a předchozí studie se od naší i navzájem lišily detaily studovaných populací a metodikou (zejména různým časem odběru vzorku od ukončení léčby). Ačkoliv léčba vedla k redukci počtu všech typů buněk, míra poklesu byla variabilní. Výraznější pokles byl pozorován pro $CD4^+$ T-ly, takže medián poměru $CD4^+ : CD8^+$ se odchýlil ještě více od fyziologických hodnot a v tomto směru tedy léčba spíše prohloubila inverzi tohoto poměru navozenou progresí CLL. Efekt CHIT na absolutní počty funkčních subpopulací lymfocytů byl stejný, jako na hlavní buněčné populace, tj. pokles na úroveň zdravých kontrol, nebo dokonce i pod ni. Poměry počtu jednotlivých subpopulací se ale změnilo komplikovanějším způsobem. Podíl naivních T-ly, který byl nižší u pacientů s progredující chorobou, než u těch s neaktivní CLL a u kontrol, poklesl ještě víc, zatímco podíl TEM buněk naopak ještě více vzrostl. Podíl TCM poklesl a podíl TEMRA se významně nezměnil. Tyto změny byly velmi obdobné pro $CD4^+$ i $CD8^+$ T-ly. Zastoupení subpopulací se tak po léčbě změnilo způsobem, který připomínal další progresi onemocnění, alespoň tedy pro naivní a TEM buňky. Literatura na toto téma je velmi omezená. Egle et al. a Gassner et al. pozorovali

pokles relativního počtu naivních T-ly po léčbě fludarabinem, podobně jako my (76, 78). Zatímco v naší práci se snížil podíl TCM, ale vzrostl podíl TEM, v uvedených studiích tyto dva subsety nerozlišovali a popisují pouze zvýšení počtu paměťových buněk. Naše analýza se však s citovanými studiemi shoduje v klíčovém závěru vzestupu relativního počtu více diferencovaných T-ly na úkor naivních buněk podobně, jako jsme pozorovali v důsledku progresu onemocnění.

Při srovnání efektu jednotlivých léčebných režimů (FCR, BR, O-Clb a R-Clb) vyšlo najevo, že chlorambucilové režimy vedly k podobnému poklesu počtů buněk jako FCR a BR. Hlavním rozdílem ve srovnání s FCR / BR bylo, že pokles absolutního počtu CD4⁺ TEMRA po O-Clb / R-Clb nedosáhl statistického významu a v souladu s tím vzestup relativního počtu této populace po léčbě byl vyšší a statistického významu dosáhl. Efekt režimu BR se překvapivě od FCR odlišoval o něco více, než efekt O-Clb / R-Clb. Změny ve smyslu vzestup / pokles počtu byly identické, nicméně změny navozené BR nedosáhly statistické významnosti v případě absolutního počtu CD8⁺ TEM a CD8⁺ TEMRA a relativního počtu CD8⁺ TCM. Navzdory těmto vyjmenovaným rozdílům byly efekty všech tří typů léčby velmi podobné. To může být překvapivé, zvláště pro chlorambucilové režimy. Jejich vliv na buněčné populace byl dosud popsán pouze ve dvou studiích. Laszlo et al. pozorovali depleci CD4⁺ T-ly u 25 nemocných s indolentními lymfomy léčených chlorambucilem s rituximabem (86). Solman et al. porovnávali důsledky léčby ibrutinibem a chlorambucilem. Zatímco ibrutinib způsobil pokles celkových T-ly, TEM a T-reg, ale ušetřil NK buňky a naivní T-ly, chlorambucil vedl k více méně uniformnímu poklesu všech buněčných populací (87). Zde předkládáme další data dokazující, že i chlorambucilové režimy mohou vést k lymfodepleci podobně, jako bendamustin, či fludarabin. Je však nezbytné zvážit i anti-CD20 monoklonální protilátku, jako možného viníka poklesu počtu T-ly. V analýze lymfocytárních populací u 52 nemocných s revmatoidní artritidou léčených monoterapií rituximabem mělo 75 % z nich pokles počtu CD4⁺ T-ly o 21-77% (97). Důvodem, proč po anti-CD20 léčbě dochází k depleci T-ly, může být ztráta cytokinů a antigen prezentující funkce, které jsou obojí poskytovány B-lymfocyty. Zřejmou slabinou srovnání léčebných režimů v naší práci je samozřejmě nízký počet pacientů v jednotlivých podskupinách a kromě toho také rozdíly ve věku a množství komorbidit.

Spojitosť mezi populacemi lymfocytů a výskytem infekčních komplikací nebyla u CLL dosud podrobně studována. Většina dostupných informací se soustředí na souvislost s konkrétním typem léčby (přirozeně léčba vedoucí k další imunopresi zvyšuje frekvenci infekcí). Keating et al., ani Gauthier et al. nepozorovali souvislost mezi počtem CD4⁺ T-ly, CD8⁺ T-ly, nebo NK buněk a výskytem infekcí po léčbě fludarabinem (40, 74). Saito et al. zase nenašli spojitost mezi infekcemi a počtem CD4⁺ buněk u 56 nemocných s lymfomy léčenými režimem BR, nebo bendamustinem v monoterapii (82). Na druhou stranu v další studii s podstatně větším počtem pacientů bylo prokázáno, že nízký počet CD4⁺ T-ly v období 3 let po léčbě BR je rizikovým faktorem závažných infekcí (81). V naší analýze jsme samostatně posuzovali nemocné s neaktivní a progredující chorobou. V první jmenované skupině byly infekce častější u nemocných s vyšším absolutním i relativním počtem klonálních B-ly, s nižším relativním počtem polyklonálních B-ly, NK buněk a CD4⁺ T-ly a také s nižším poměrem CD4⁺ T-ly a NK buněk ke klonálním B-ly. Všechny tyto výsledky ukazují spíše na význam velikosti nádorové nálože, než na význam absolutního počtu samotných CD4⁺ T-ly, nebo NK buněk, neboť ten se u nemocných s infekcemi i bez infekcí významně nelišil. Zajímavější byly výsledky u nemocných s progredující chorobou. Pacienti s infekcemi měli nižší podíl naivních CD4⁺ T-ly a vyšší absolutní počet CD8⁺ TEM. Lze se domnívat, že relativní nedostatek naivních T-ly

neumožňuje adekvátně reagovat na nové antigenní podněty a kromě progresu CLL a event. rozvoje dalších malignit může také zvyšovat náchylnost nemocných k infekcím.

Souvislost počtu T-reg s prognózou CLL je dobře známá. Řada studií popsala zvýšení absolutního či relativního počtu T-reg u nemocných s CLL ve srovnání s kontrolami, tak jak jsme ho pozorovali i my (62-66, 98-101). Stejně tak vyšší počet T-reg, který jsme zjistili u pacientů s progredující CLL ve srovnání s neaktivní, byl již dříve popsán (64, 65, 100). Ve studiích Weisse et al. a D'Areny et al. byl vyšší relativní, resp. absolutní počet T-reg spojen s kratším TTFT (66, 98). Dasgupta et al. pozorovali kratší TTFT i OS u pacientů s T-reg > 15,5 % ze všech CD4⁺ T-ly (99). V naší studii byl vyšší absolutní počet T-reg spojen s kratším TTNT nemocných, kteří podstoupili léčbu (p=0,042). Kromě T-reg jsme u žádné další hlavní buněčné populace nepozorovali prognostický význam ve smyslu TTFT nemocných se stabilní chorobou, ani TTNT a OS nemocných s progredující chorobou. Jak bylo zmíněno, relativní pokles naivních T-ly s expanzí více diferencovaných subsetů byl v naší studii pozorován při progresi onemocnění, dále ještě více po léčbě a také u nemocných s infekcemi. V neposlední řadě pak byl stejný jev spojen i s horší prognózou. Pacienti s neaktivní chorobou a nižším relativním počtem naivních CD4⁺ i CD8⁺ T-ly měli kratší TTFT. To dále podporuje naši teorii o roli naivních T-ly v kontrole maligního klonu. Pokud je nám známo, jedná se o dosud nepublikované nálezy. Další zjištění v kohortě pacientů s neaktivní chorobou, tj. asociace vyššího absolutního počtu CD4⁺ TCM a TEM a vyššího relativního počtu CD4⁺ TEM s kratším TTFT do tohoto konceptu zapadají a také nebyly dosud publikovány. Vyšší absolutní počet CD4⁺ TCM byl dále spojen s kratším OS a TTNT nemocných léčených CHIT, přičemž souvislost s TTNT zůstala signifikantní i v multivariantní analýze nezávisle na léčebném režimu.

Informací na téma souvislosti známých prognostických ukazatelů se změnami počtů buněk je v literatuře ještě méně, než v případě koncentrací Ig. Brusa et al. popsali souvislost vyššího relativního počtu CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEMRA buněk se stádiem B / C dle Bineta, s nemutovanými IGHV, del 11q a del 17p (59). Jednalo se o smíšený soubor léčených i neléčených nemocných. V další studii měli nemocní s vyšším relativním počtem CD8⁺ TEM a také nižším relativním počtem CD8⁺ TCM častěji nemutované IGHV a pokročilejší chorobu (Binet B / C) (60). V naší studii se u nemocných s neaktivní chorobou pojily nemutované IGHV s vyšším absolutním počtem CD8⁺ T-ly, nižším relativním počtem naivních CD4⁺ T-ly, vyšším relativním počtem CD4⁺ TEM a vyšším absolutním počtem CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEMRA. U nemocných s progredující chorobou měli ti s nemutovanými IGHV vyšší relativní počet T-reg. V obou skupinách se jedná o obdobné rozdíly, jaké byly pozorovány i při vzájemném porovnání mezi nemocnými s neaktivní a progredující chorobou, tj. i v rámci jedné z těchto skupin mají nemocní s nemutovanými IGHV změny spojené s progresí onemocnění. To není překvapivý závěr. Je však zajímavé, že situace je přesně opačná, než v případě koncentrací Ig, kde pacienti s nemutovanými IGHV měli vyšší koncentrace některých tříd a podtříd. Překvapivé výsledky nepřinesla ani analýza souvislosti s dalšími prognostickými faktory (provedená jen u progredujících nemocných, protože u těch s neaktivní chorobou se nevyskytovaly). Pacienti s del 17p a / nebo del 11q měli vyšší absolutní i relativní počty celkových a klonálních B-ly a odpovídajícím způsobem snížené relativní počty celkových T-ly a CD8⁺ T-ly. Dále také vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM. Pacienti s mutací *TP53* měli vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM. Ve všech případech jsou zde stejně jako u IGHV změny typické pro progresi onemocnění častější u skupiny s nepříznivými prognostickými faktory. Jestliže tedy v případě koncentrací Ig bylo konstatováno, že hypogamaglobulinémie potřebuje k rozvoji především čas a u agresivní choroby s nepříznivými prognostickými rysy a rychlou progresí se zřejmě nestihne rozvinout, zde lze naopak říct, že změny buněčných populací jsou dynamičtější a dle očekávání u

agresivnější choroby hlubší. Nemocní ve stádiu Rai III-IV měli ve srovnání s těmi ve stádiu Rai 0-II vyšší absolutní i relativní počty celkových a klonálních B-ly a z toho důvodu nižší relativní počty ostatních hlavních buněčných populací, přesto, že jejich absolutní počty se nelišily. To jednoduše odpovídá větší pokročilosti jejich choroby. Pacienti ve stádiu Rai III-IV měli ale také vyšší relativní i absolutní počet naivních CD4⁺ T-ly, vyšší absolutní počet CD4⁺ TCM, vyšší absolutní počet naivních CD8⁺ T-ly a vyšší relativní i absolutní počet CD8⁺ TCM. Rozdíly ve funkčních subsetech mezi nemocnými rozdělenými dle stádia choroby se tedy výše uvedenému konceptu vymykají – pacienti s vyššími stádii dle Raie mají sice vyšší počty TCM buněk, což odpovídá progredující chorobě, ale zároveň i vyšší počty naivních buněk a nejsou zvýšeny TEM ani TEMRA. Zdůvodnění je zde problematické. Je jistě nutno připustit i možnost chyby malých čísel, nabízí se však také podobné vysvětlení jako u koncentrací Ig – všichni pacienti s progredující chorobou, které jsme takto analyzovali, byli indikováni k léčbě, i když z různých důvodů. I ti ve stádiu Rai I či II měli vysoce aktivní chorobu. Od srovnání skupin rozdělených podle stádia nelze tedy v takové situaci čekat stejné rozdíly, jako od srovnání nemocných s neaktivní a progredující chorobou, tedy jinak řečeno neindikovaných a indikovaných k léčbě. Proč měli v naší analýze pacienti indikovaní na základě organomegalie (Rai I-II) méně naivních T-ly, než pacienti indikovaní na základě cytopenie (Rai III-IV), zůstává nejasné. Je možné, že masivní lymfadenopatie je v mnoha případech spojena s větší nádorovou náloží a tedy aktivnější chorobou, než "pouhá" infiltrace kostní dřeně, nebo je zkrátka biologie choroby odlišná a vede k jinému spektru změn v subpopulacích T-ly.

9. Závěry

Pacienti s CLL indikovanou k léčbě měli ve srovnání s těmi s neaktivní chorobou nižší koncentrace všech tříd a podtříd Ig. Jedná se o první publikovanou analýzu tohoto typu. Progredující choroba byla také spojena s vzestupem počtu většiny lymfocytárních populací včetně T-reg a s expanzí vyzrálějších funkčních subpopulací (TCM, TEM, TEMRA) na úkor naivních buněk.

Unikátním závěrem této studie je dále i vzestup IgA po léčbě, což bylo dosud popsáno pouze u léčby ibrutinibem, ale nikoliv po CHIT. Na základě předložených výsledků se lze domnívat, že se tedy nejedná o jev zcela specifický pouze pro ibrutinib, ale může jít alespoň částečně o důsledek potlačení aktivity CLL jakoukoliv léčbou.

CHIT vedla k poklesu lymfocytárních populací na, nebo i pod úroveň pozorovanou u zdravých kontrol. Naše práce je první, která podrobně popisuje změny funkčních subpopulací T-ly po léčbě BR a doplňuje velmi omezená data, která jsou v tomto směru k dispozici o léčbě FCR a léčbě chlorambucilem. Po podání CHIT došlo i k dalšímu poklesu podílu naivních CD4⁺ i CD8⁺ buněk. Zároveň byl prokázán negativní prognostický význam deplece naivních T-ly i expanze CD4⁺ TCM a TEM. Nižší podíl naivních CD4⁺ T-ly a vyšší absolutní počet CD8⁺ TEM byly také asociovány s vyšším výskytem infekčních komplikací. Všechna tato pozorování jsou původní a nebyla dosud publikována.

U nemocných s nepříznivými prognostickými znaky (del 11q, dysfunkce *TP53*) byly zjištěny vyšší koncentrace Ig, pravděpodobně jako důsledek kratšího trvání choroby s agresivním průběhem. Opět jde o dosud nepopsanou skutečnost. Lymfocytární populace u nemocných s nepříznivými prognostickými znaky naopak vykazují změny charakteristické pro progredující chorobu.

10. Použitá literatura

1. Panovská A, Doubek M, Brychtová Y, Mayer J. Chronic lymphocytic leukemia and focusing on epidemiology and management in everyday hematologic practice: recent data from the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2010;10(4):297-300.
2. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):524-548.
3. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975;46(2):219-234.
4. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev.* 2009;23(1):25-47.
5. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981;48:198-206.
6. Dighiero G, Maloum K, Desablens B et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 1998;338(21):1506-1514.
7. Hoehstetter MA, Busch R, Eichhorst B et al. Early, risk-adapted treatment with fludarabine in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: results of the CLL1 trial of the German CLL study group. *Leukemia.* 2017;31(12):2833-2837.
8. Herling CD, Cymbalista F, Groß-Ophoff-Müller C et al. Early treatment with FCR versus watch and wait in patients with stage Binet A high-risk chronic lymphocytic leukemia (CLL): a randomized phase 3 trial. *Leukemia.* 2020;34(8):2038-2050.
9. Langerbeins P, Zhang C, Robrecht S et al. The CLL12 trial: ibrutinib vs placebo in treatment-naïve, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2022;139(2):177-187.
10. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1164-1174.
11. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):928-942.
12. Goede V, Fischer K, Busch R et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2014;370(12):1101-1110.
13. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE et al. Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2019;381(5):432-443.
14. Burger JA, Barr PM, Robak T et al. Long-term efficacy and safety of first-line ibrutinib treatment for patients with CLL/SLL: 5 years of follow-up from the phase 3 RESONATE-2 study. *Leukemia.* 2020;34(3):787-798.

15. Sharman JP, Egyed M, Jurczak W et al. Acalabrutinib with or without obinutuzumab versus chlorambucil and obinutuzumab for treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia (ELEVATE TN): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2020;395(10232):1278-1291.
16. Al-Sawaf O, Zhang C, Tandon M et al. Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(9):1188-1200.
17. Smolej L, Vodárek P, Écsiová D, Šimkovič M. Chemoimmunotherapy in the First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia: Dead Yet, or Alive and Kicking?. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13):3134.
18. Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br Med Bull*. 2008;87:49-62.
19. Hamblin TJ. Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33(2):230-239.
20. Dasanu CA, Alexandrescu DT. Risk for second nonlymphoid neoplasms in chronic lymphocytic leukemia. *MedGenMed*. 2007;9(4):35.
21. Molica S. Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment. *Leuk Lymphoma*. 1994;13(3-4):203-214.
22. Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33(2):240-249.
23. Molica S, Levato D. What is changing in the natural history of chronic lymphocytic leukemia?. *Haematologica*. 2001;86(1):8-12.
24. Hudson RP, Wilson SJ. Hypogammaglobulinemia and chronic lymphatic leukemia. *Cancer*. 1960;13:200-204.
25. Mauro FR, Morabito F, Vincelli ID et al. Clinical relevance of hypogammaglobulinemia, clinical and biologic variables on the infection risk and outcome of patients with stage A chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2017;57: 65-71.
26. Parikh SA, Leis JF, Chaffee KG et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer*. 2015;121(17):2883-2891.
27. Singh N, Mott SL, Sutamtewagul G et al. Prevalence and the impact of hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic lymphoma patients. *EJHaem*. 2020;1(2):537-544.
28. Rozman C, Montserrat E, Viñolas N. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer*. 1988;61(2):279-283.
29. Andersen MA, Vojdeman FJ, Andersen MK et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia is a predictor of early death. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(7):1592-1599.

30. Shvidel L, Tadmor T, Braester A et al. Serum immunoglobulin levels at diagnosis have no prognostic significance in stage A chronic lymphocytic leukemia: a study of 1113 cases from the Israeli CLL Study Group. *Eur J Haematol*. 2014;93(1):29-33.
31. Ishdorj G, Streu E, Lambert P, et al. IgA levels at diagnosis predict for infections, time to treatment, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Adv*. 2019;3(14):2188-2198.
32. Korona-Glowniak I, Grywalska E, Grzegorzczak A, Roliński J, Glowniak A, Malm A. Bacterial Colonization in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Factors Associated with Infections and Colonization. *J Clin Med*. 2019;8(6):861.
33. Andersen MA, Eriksen CT, Brieghel C et al. Incidence and predictors of infection among patients prior to treatment of chronic lymphocytic leukemia: a Danish nationwide cohort study. *Haematologica*. 2018;103(7):e300-e303.
34. Crassini K.R., Zhang E., Balendran S. et al. Humoral immune failure defined by immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass deficiency is associated with shorter treatment-free and overall survival in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Br. J. Haematol*. 2018;181:97-101.
35. Corbingi A, Innocenti I, Tomasso A et al. Monoclonal gammopathy and serum immunoglobulin levels as prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2020;190(6):901-908.
36. Francis S, Karanth M, Pratt G et al. The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2006;107(5):1023-1033.
37. Visentin A, Compagno N, Cinetto F et al. Clinical profile associated with infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. Protective role of immunoglobulin replacement therapy. *Haematologica*. 2015;100(12):e515-e518.
38. Hensel M, Kornacker M, Yammeni S, Egerer G, Ho AD. Disease activity and pretreatment, rather than hypogammaglobulinaemia, are major risk factors for infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;122(4):600-606.
39. Freeman JA, Crassini KR, Best OG et al. Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(1):99-104.
40. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. 1998;92:1165-1171.
41. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23:4079-4088.
42. Casulo C, Maragulia J, Zelenetz AD. Incidence of hypogammaglobulinemia in patients receiving rituximab and the use of intravenous immunoglobulin for recurrent infections. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13:106-111.

43. Czuczman MS, Koryzna A, Mohr A et al. Rituximab in combination with fludarabine chemotherapy in lowgrade or follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:694-704.
44. Roberts DM, Jones RB, Smith RM et al. Rituximab-associated hypogammaglobulinemia: incidence, predictors and outcomes in patients with multi-system autoimmune disease. *J autoimmun*. 2015;57:60-65.
45. Hiddemann W, Barbui AM, Canales MA et al. Immunochemotherapy With Obinutuzumab or Rituximab for Previously Untreated Follicular Lymphoma in the GALLIUM Study: Influence of Chemotherapy on Efficacy and Safety. *J Clin Oncol*. 2018;36(23):2395-2404.
46. Grigg A, Dyer MJ, Díaz MG et al. Safety and efficacy of obinutuzumab with CHOP or bendamustine in previously untreated follicular lymphoma. *Haematologica*. 2017;102(4):765-772.
47. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(1):32-42.
48. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):48-58.
49. Sun C, Tian X, Lee YS et al. Partial reconstitution of humoral immunity and fewer infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Blood*. 2015;126(19):2213-2219.
50. Barrientos JC, O'Brien S, Brown JR et al. Improvement in Parameters of Hematologic and Immunologic Function and Patient Well-being in the Phase III RESONATE Study of Ibrutinib Versus Ofatumumab in Patients With Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(12):803-813.
51. Cassin R, Visentin A, Giannarelli D et al. Increase of immunoglobulin A during ibrutinib therapy reduces infection rate in chronic lymphocytic leukemia patients. *Hematol Oncol*. 2021;39(1):141-144.
52. Burger JA, Sivina M, Jain N et al. Randomized trial of ibrutinib vs ibrutinib plus rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2019;133(10):1011-1019.
53. Palmer S, Hanson CA, Zent CS et al. Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2008;141(5):607-614.
54. Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L et al. Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(10):1829-1836.
55. Nunes C, Wong R, Mason M, Fegan C, Man S, Pepper C. Expansion of a CD8(+)PD-1(+) replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. *Clin Cancer Res*. 2012;18(3):678-687.

56. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing*. 2008;5:6.
57. Romero P, Zippelius A, Kurth I et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007;178(7):4112-4119.
58. Wu J, Xu X, Lee EJ et al. Phenotypic alteration of CD8+ T cells in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic reprogramming. *Oncotarget*. 2016;7(26):40558-40570.
59. Brusa D, Serra S, Coscia M et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):953-963.
60. Gonnord P, Costa M, Abreu A et al. Multiparametric analysis of CD8+ T cell compartment phenotype in chronic lymphocytic leukemia reveals a signature associated with progression toward therapy. *Oncoimmunology*. 2019;8(4):e1570774.
61. Jadidi-Niaragh F, Ghalamfarsa G, Memarian A et al. Downregulation of IL-17-producing T cells is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol*. 2013;34(2):929-940.
62. Mpakou VE, Ioannidou HD, Konsta E et al., Quantitative and qualitative analysis of regulatory T cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2017;60:74-81.
63. Piper KP, Karanth M, McLarnon A et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(2):154-163.
64. Lad DP, Varma S, Varma N, Sachdeva MU, Bose P, Malhotra P. Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(5):1012-1019.
65. Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A et al. Increased frequency of CD8(+) and CD4(+) regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. *Cancer Invest*. 2013;31(2):121-131.
66. D'Arena G, D'Auria F, Simeon V et al. A shorter time to the first treatment may be predicted by the absolute number of regulatory T cells in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2012;87(6):628-631.
67. Jadidi-Niaragh F, Jeddi-Tehrani M, Ansaripour B, Razavi SM, Sharifian RA, Shokri F. Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*. 2012;29(5):3561-3569.
68. Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Rodriguez AP et al., Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. *PLoS One*. 2014;9(10):e108326.
69. Costello RT, Knoblauch B, Sanchez C, Mercier D, Le Treut T, Sébahoun G. Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2012;135(2):151-157.

70. MacFarlane AW 4th, Jillab M, Smith MR et al. NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors. *Oncoimmunology*. 2017;6(7):e1330235.
71. Wang WT, Zhu HY, Wu YJ et al. Elevated absolute NK cell counts in peripheral blood predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(3):449-457.
72. Byrd JC, Hargis JB, Kester KE et al. Opportunistic pulmonary infections with fludarabine in previously treated patients with low-grade lymphoid malignancies: a role for *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis. *Am. J. Hematol*. 1995;49:135-142.
73. Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann. Intern. Med*. 1998;129:559-566.
74. Gauthier M, Durrieu F, Martin E et al. Prognostic role of CD4 T-cell depletion after frontline fludarabine, cyclophosphamide and rituximab in chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer*. 2019;19(1):809.
75. Ysebaert L, Gross E, Kühlein E et al. Immune recovery after fludarabine-cyclophosphamide-rituximab treatment in B-chronic lymphocytic leukemia: implication for maintenance immunotherapy. *Leukemia*. 2010;24(7):1310-1316.
76. Egle A, Weiss L, Gassner F et al. Minimal residual disease (MRD) and T/NK cell dynamics during Fludarabine, Cyclophosphamide plus Rituximab (FCR) followed by Fludarabine plus Rituximab (FR) and remission maintenance therapy with Rituximab in previously untreated B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): risk factor stratification in the Chairou study. *Blood*. 2008;112(11):1089-1089.
77. Beyer M, Kochanek M, Darabi K et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005;106(6):2018-2025.
78. Gassner FJ, Weiss L, Geisberger R et al. Fludarabine modulates composition and function of the T cell pool in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(1):75-85.
79. Mackall CL. T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Stem Cells*. 2000;18(1):10-18.
80. Sharabi A, Haran-Ghera N. Immune recovery after cyclophosphamide treatment in multiple myeloma: implication for maintenance immunotherapy. *Bone Marrow Res*. 2011;2011:269519.
81. Martínez-Calle N, Hartley S, Ahearne M et al. Kinetics of T-cell subset reconstitution following treatment with bendamustine and rituximab for low-grade lymphoproliferative disease: a population-based analysis. *Br J Haematol*. 2019;184(6):957-968.
82. Saito H, Maruyama D, Maeshima AM et al. Prolonged lymphocytopenia after bendamustine therapy in patients with relapsed or refractory indolent B-cell and mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2015;5(10):e362.

83. Gaiolla R, Hartley S, Beech A et al. Extended follow-up of CD4+ T cell recovery kinetics in a large cohort of patients with B-cell lymphoproliferative disease treated with rituximab-bendamustine. *Hematol Oncol.* 2021;39(1):137-140.
84. García Muñoz R, Izquierdo-Gil A, Muñoz A, Roldan-Galiacho V, Rabasa P, Panizo C. Lymphocyte recovery is impaired in patients with chronic lymphocytic leukemia and indolent non-Hodgkin lymphomas treated with bendamustine plus rituximab. *Ann Hematol.* 2014;93(11):1879-1887.
85. Georgiana G, Perez-Andres M, Barrena S et al. Effects of Bendamustine plus Rituximab on the distribution of normal peripheral blood leucocyte populations in advanced stage chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood.* 2013;122(21):5289.
86. Laszlo D, Bassi S, Andreola G et al. Peripheral T-lymphocyte subsets in patients treated with Rituximab-Chlorambucil combination therapy for indolent NHL. *Ann Hematol.* 2006;85(11):813-814.
87. Solman IG, Blum LK, Hoh HY et al. Ibrutinib restores immune cell numbers and function in first-line and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2020;97:106432.
88. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 2018;131(25):2745-2760.
89. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA et al. Rituximab plus chlorambucil as first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia: Final analysis of an open-label phase II study. *J Clin Oncol.* 2014;32(12):1236-1241.
90. Kay NE, Perri RT. Evidence that large granular lymphocytes from B-CLL patients with hypogammaglobulinemia down-regulate B-cell immunoglobulin synthesis. *Blood.* 1989;73(4):1016-1019.
91. Sampalo A, Navas G, Medina F, Segundo C, Cámara C, Brieva JA. Chronic lymphocytic leukemia B cells inhibit spontaneous Ig production by autologous bone marrow cells: role of CD95-CD95L interaction. *Blood.* 2000;96(9):3168-3174.
92. Criado I, Muñoz-Criado S, Rodríguez-Caballero A et al. Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Host virus and pneumococcus-specific immune responses in high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: implications for disease progression. *Haematologica.* 2017;102(7):1238-1246.
93. Puzzolo MC, Del Giudice I, Peragine N et al. TH2/TH1 Shift Under Ibrutinib Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front. Oncol.* 2021;11:637186.
94. Bojarska-Junak A, Hus I, Sieklucka M et al. Natural killer-like T CD3+/CD16+CD56+ cells in chronic lymphocytic leukemia: intracellular cytokine expression and relationship with clinical outcome. *Oncol Rep.* 2010;24(3):803-810.
95. Riches JC, Davies JK, McClanahan F et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood.* 2013;121(9):1612-1621.

96. Rissiek A, Schulze C, Bacher U et al. Multidimensional scaling analysis identifies pathological and prognostically relevant profiles of circulating T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. 2014;135(10):2370-2379.
97. Mélet J, Mulleman D, Goupille P, Ribourtout B, Watier H, Thibault G. Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2783-2790.
98. Weiss L, Melchardt T, Egle A, Grabmer C, Greil R, Tinhofer I. Regulatory T cells predict the time to initial treatment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2011;117(10):2163-2169.
99. Dasgupta A, Mahapatra M, Saxena R. A study for proposal of use of regulatory T cells as a prognostic marker and establishing an optimal threshold level for their expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(6):1831-1838.
100. Giannopoulos K, Schmitt M, Kowal M et al. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep*. 2008;20(3):677-682.
101. D'Arena G, Rossi G, Minervini MM et al. Circulating regulatory T cells in "clinical" monoclonal B-cell lymphocytosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(4):915-923.

11. Přehled publikační činnosti autora

11.1. Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

Panovská A, Smolej L, Lysák D, Brychtová Y, Šimkovič M, Motyčková M, **Vodárek P**, Lindtnerová M, Trbušek M, Malčíková J., Pospíšilová Š. Mayer J, Doubek M. The outcome of chronic lymphocytic leukemia patients who relapsed after fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab. *Eur J Haematol*. 2013;90(6):479-485.

Šimkovič M, **Vodárek P**, Motyčková M, Belada D, Vrbacký F, Žák P, Smolej L. Venous thromboembolism in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Thromb Res*. 2015;136(6):1082-1086.

Šimkovič M, Motyčková M, Belada D, **Vodárek P**, Kapoor R, Jaffar H, Vrbacký F, Žák P, Smolej L. Five years of experience with rituximab plus high-dose dexamethasone for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Arch Med Sci*. 2016; 12(2):421-427.

Králíčková P, Kuhnová J, Souček O, **Vodárek P**, Žák P, Šimkovič M, Motyčková M, Smolej L, Malá E, Andrýs C, Krejsek J, Thon V. Antibodies against Pneumococcal Capsular Polysaccharides and Natural Anti-Galactosyl (Alpha-Gal) in Patients with Humoral Immunodeficiencies. *J Immunol Res*. 2017;2017:7304658.

Panovská A, Němcová L, Nekvindová L, Špaček M, Šimkovič M, Papajík T, Brejcha M, Lysák D, Zuchnická J, Novák J, Starostka D, Poul H, Vrbacký F, **Vodárek P**, Urbanová R, Plevová K, Pospíšilová Š, Mašlejová S, Brychtová Y, Koriťáková E, Smolej L, Doubek M. Real-world data on efficacy and safety of obinutuzumab plus chlorambucil, rituximab plus chlorambucil, and rituximab plus bendamustine in the frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: The GO-CLLEAR Study by the Czech CLL Study Group. *Hematol Oncol*. 2020;38(4):509-516.

Smolej L, Turcsányi P, Kubová Z, Zuchnická J, Mihályová J, Šimkovič M, **Vodárek P**, Krčmeryová M, Móciková H, Brejcha M, Špaček M. External validation of International Prognostic Score for asymptomatic early stage chronic lymphocytic leukaemia and proposal of an alternative score. *Br J Haematol*. 2021;193(1):133-137.

Šimkovič M, **Vodárek P**, Motyčková M, Écsiová D, Rozsivalová P, Móciková H, Štěpánková P, Sýkorová A, Hrochová K, Vrbacký F, Belada D, Žák P, Smolej L. Rituximab, Cyclophosphamide and Dexamethasone (RCD) Chemoimmunotherapy for Relapsed Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Eur J Clin Invest*. 2021;51(4):e13421.

Vodárek P, Écsiová D, Řezáčová V, Souček O, Šimkovič M, Vokurková D, Belada D, Žák P, Smolej L. A comprehensive assessment of lymphocyte subsets, their prognostic significance, and changes after first-line therapy administration in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Med*. 2022;10.1002/cam4.5492.

11.2. Ostatní práce v impaktovaném časopise

Smolej L, **Vodárek P**, Écsiová D, Šimkovič M. Chemoimmunotherapy in the First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia: Dead Yet, or Alive and Kicking?. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13):3134.

11.3. Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

Šimkovič M, **Vodárek P**, Motyčková M, Žák P, Smolej, L. Infúzní toxicita rituximabu u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. *Vnitr Lek.* 2015;61(7-8):626-632.

11.4. Ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

Šimkovič M, Motyčková M, **Vodárek P**, Smolej L. Léčba starších a komorbidních nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. *Onkologie.* 2017;11(3):108-114.

Vodárek P, Smolej L, Belada D, Šimkovič M, Écsiová D, Žák P. Změny v imunitním systému u neléčených nemocných s chronickou lymfocytární leukémií – část 1: specifická imunita. *Transfuze Hematol dnes* 2021;(2):128-136.

Vodárek P, Smolej L, Belada D, Šimkovič M, Écsiová D, Žák P. Změny v imunitním systému u neléčených nemocných s chronickou lymfocytární leukémií – část 2: nespecifická imunita. *Transfuze Hematol dnes* 2021;(3):218-225.

11.5. Přednášky

Vodárek P.: Prognostický význam zobrazovacích metod u chronické lymfocytární leukémie, 58. studentská vědecká konference, LF UK HK, 15.5.2012

Vodárek P.: Sledování minimální reziduální nemoci u lymfomu z buněk pláště, 58. studentská vědecká konference, LF UK HK, 15.5.2012

Vodárek P.: Žilní tromboembolická nemoc u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií, 59. studentská vědecká konference, LF UK HK, 14.5.2013

Vodárek P.: Hodnocení imunodeprese u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií, plenární zasedání české skupiny pro chronickou lymfocytární leukémii, 18.3.2016

Vodárek P.: Podpůrná terapie u CLL, Seminář novinky v léčbě lymfomů a CLL, Hradec Králové, 11.10.2018

Vodárek P.: Doporučené léčebné postupy u CLL v roce 2019, Seminář novinky v léčbě lymfomů a CLL, Hradec Králové, 16.10.2019

Vodárek P.: Imunodeficit nemocných s chronickou lymfocytární leukémií v éře cílené léčby, Konference imunodeficiency v mezioborové spolupráci, Praha, 7.12.2019

Vodárek P.: Ukazatele imunodeprese u chronické lymfocytární leukémie, plenární zasedání české skupiny pro chronickou lymfocytární leukémii, 1.4.2022

11.6. Plakátová sdělení na odborných setkáních

Vodárek P, Šimkovič M, Motyčková M, Belada D, Žák P, Smolej L. Žilní tromboembolická nemoc: častá komplikace nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. *XXVIII Olomoucké hematologické dny.* 2014; P41/2611

Smolej L, Andrýs C, **Vodárek P**, Šimkovič M, Vrbacký F, Motyčková M, Belada D, Žák P. Mikroprostředí u chronické lymfocytární leukémie: prognostický význam cirkulujících angiogenních faktorů. *XXIX Olomoucké hematologické dny*. 2015; P9/2733

Vodárek P, Andrýs C, Jurenková A, Motyčková M, Řezáčová V, Souček O, Šimkovič M, Vokurková D, Belada D, Žák P, Smolej L. Hodnocení imunitních defektů u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií: pilotní výsledky. *XXX Olomoucké hematologické dny*. 2016; P36/2946

Vodárek P, Andrýs C, Jurenková A, Motyčková M, Řezáčová V, Souček O, Šimkovič M, Vokurková D, Belada D, Žák P, Smolej L. Comprehensive assessment of immune functions in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL): pilot results. *XVII International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*. 2017; P127

Vodárek P, Andrýs C, Jurenková A, Motyčková M, Řezáčová V, Souček O, Šimkovič M, Vokurková D, Belada D, Žák P, Smolej L. Komplexní hodnocení imunitních funkcí u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. *I. Český hematologický a transfuziologický sjezd*. 2018; P03

Vodárek P, Andrýs C, Jurenková A, Motyčková M, Řezáčová V, Souček O, Šimkovič M, Vokurková D, Belada D, Žák P, Smolej L. Complex evaluation of immune functions in patients with chronic lymphocytic leukemia. *24th European Hematology Association Congress*. 2019; PF395

Vodárek P, Andrýs C, Écsiová D, Řezáčová V, Souček O, Šimkovič M, Vokurková D, Belada D, Žák P, Smolej L. Změny parametrů imunitního systému u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. *II. Český hematologický a transfuziologický sjezd*. 2021; P55

Vodárek P, Andrýs C, Écsiová D, Řezáčová V, Souček O, Šimkovič M, Vokurková D, Belada D, Žák P, Smolej L. Comprehensive assessment of immune functions in patients with chronic lymphocytic leukemia. *19th International Medical Postgraduate Conference*. 2022; P08

11.7. Abstrakta

Bachh A, **Vodárek P**, Šimkovič M, Motyčková M, Smolej L. The Role of Imaging Methods in CLL: Significant Internal Lymphadenopathy is Frequent and Associated with Shorter Overall Survival. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 2011; 11 (Suppl 2): S199-200.