

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program

Vnitřní nemoci

Prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie

Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia

MUDr. Monika Motyčková

Školitel: doc. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

Hradec Králové, 15.4.2013

Obhajoba dne:

Prohlášení autora:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 15.4.2013

MUDr. Monika Motyčková

Poděkování:

Na prvním místě děkuji své rodině, zejména manželovi, za neocenitelnou podporu a trpělivost. Děkuji Mgr. Vladimíře Řezáčové, Ph.D. a doc. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D. za vynikající spolupráci při hodnocení vybraných ukazatelů. Dále děkuji svému školiteli doc. MUDr. Pavlu Žákovi, Ph.D. za cennou podporu, pomoc, rady a připomínky během celého doktorského studia. Velký a nezanedbatelný dík patří mému vynikajícímu kolegovi a skvělému člověku doc. MUDr. Lukášovi Smolejovi, Ph.D., bez jehož pomoci by tato práce vznikala jen obtížně. V neposlední řadě děkuji všem kolegyním a kolegům ze IV. interní hematologické kliniky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové za spolupráci a nemenší dík patří i všem pacientům, kteří dobrovolně poskytli svá data ke zpracování.

Disertační práce byla podpořena výzkumným záměrem PRVOUK P37/08/400 Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, grantem Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky IGA NT/13412-4 a výzkumným záměrem 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	7
2. Úvod	11
3. Chronická lymfocytární leukemie (CLL) - teoretický úvod	12
3.1 CLL obecně	12
3.1.1 Změna pohledu na CLL v posledních letech	12
3.2 Prognostické faktory u CLL - teoretický úvod	16
3.2.1 Klasické prognostické faktory	17
3.2.2 Nové prognostické faktory	23
3.2.3 Další nové prognostické faktory	30
3.3 Léčba CLL - přehled nejdůležitějších postupů a léčiv	39
3.4 CLL - shrnutí	43
4. Vybrané ukazatele angiogeneze a apoptózy u CLL - teoretický úvod	44
4.1 Signální dráha nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) a její význam u CLL	44
4.1.1 Význam exprese některých molekul a cytokinů hrajících roli v patogenezi CLL (mimo tumor nekrotizujícího faktoru alfa) regulované signální dráhou NF- κ B	45
4.2 Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) a jeho význam u CLL	48
4.2.1 Tumor nekrotizující faktor alfa obecně	48
4.2.2 Tumor nekrotizující faktor alfa u CLL	49
4.3 Transformující růstový faktor beta (TGF- β), jeho receptory a význam u CLL	50
4.3.1 Transformující růstový faktor beta a jeho receptory obecně	50
4.3.2 Transformující růstový faktor beta a jeho receptory u CLL	52
4.4 Fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2), jeho receptory a význam u CLL	54

4.4.1	Fibroblastový růstový faktor-2 a jeho receptory obecně	54
4.4.2	Fibroblastový růstový faktor-2 a jeho receptory u CLL.....	55
5.	Pracovní hypotézy a cíle disertační práce	58
5.1	Pracovní hypotézy	58
5.2	Cíle disertační práce	58
6.	Nemocní a metody, statistická analýza	60
6.1	Soubor nemocných	60
6.2	Použité metody ke stanovení vybraných ukazatelů apoptózy a angiogeneze	63
6.2.1	Stanovení sérových koncentrací TNF- α , TGF- β 1 a FGF-2.....	63
6.2.2	Stanovení exprese receptoru typu II pro TGF- β (TGF β RII) a receptoru typu 2 pro FGF-2 (FGFR2)	64
6.3	Statistická analýza	65
7.	Výsledky	66
7.1	Hodnocení sérových koncentrací TNF- α a jejich souvislost s prognostickými faktory a klinickým průběhem CLL	67
7.2	Hodnocení sérových koncentrací TGF- β 1 a exprese TGF β RII a jejich souvislost s prognostickými faktory a klinickým průběhem CLL	74
7.2.1	Hodnocení sérových koncentrací TGF- β 1.....	74
7.2.2	Hodnocení exprese TGF β RII.....	81
7.3	Hodnocení sérových koncentrací FGF-2 a exprese FGFR2 a jejich souvislost s prognostickými faktory a klinickým průběhem CLL	83
7.3.1	Hodnocení sérových koncentrací FGF-2.....	83
7.3.2	Hodnocení exprese FGFR2	86
8.	Diskuze.....	92
8.1	Prognostický význam sérových koncentrací TNF- α	92
8.2	Prognostický význam sérových koncentrací TGF- β 1 a exprese TGF β RII.....	94

8.3 Prognostický význam sérových koncentrací FGF-2 a exprese FGFR2.....	96
8.4 Možné nové cílené léčebné směry u CLL	100
9. Závěry	102
10. Literatura	105
11. Přehled obrazové dokumentace a tabulek	135
11.1 Tabulky.....	135
11.2 Grafy.....	135
11.3 Obrázky	137
12. Přílohy	138
12.1 Summary	138

1. Seznam použitých zkratek

ADAM29	a desintegrin and metalloproteinase domain 29
AID	activation-induced cytidine deaminase
ALC	absolute lymphocyte count = absolutní počet lymfocytů
ATM	ataxia teleangiectasia mutated = gen mutovaný u ataxie-teleangiektázie
B2M	beta 2-mikroglobulin
BAFF	B-cell activating factor = B-lymfocyty aktivující faktor
BAFF-R	B-cell activating factor receptor = receptor pro B-lymfocyty aktivující faktor
BCR	receptor pro B-lymfocyty
CD	cluster of differentiation = diferenciační znak
CLL	chronic lymphocytic leukemia = chronická lymfocytární leukemie
CLLU1	CLL upregulated gene1 = gen zvýšený u CLL1
CMV	cytomegalovirus
COX-2	cyklooxygenáza-2
CR	complete remission = kompletní remise
CT	computer tomography = počítačová tomografie
del	delece
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EFS	event-free survival = období bez události
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FADD	Fas Associated Death Domains
FC	fludarabin, cyklofosfamid (léčebný režim)
FCR	fludarabin, cyklofosfamid, rituximab (léčebný režim)
FGF-2 (bFGF)	fibroblast growth factor-2 = fibroblastový růstový faktor-2 (bazický fibroblastový růstový faktor)
FGFR2	typ 2 receptoru pro fibroblastový růstový faktor-2
FISH	fluorescenční hybridizace <i>in situ</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FK506	tacrolimus
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor = kolonie stimulující faktor pro granulocyty

GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor = kolonie stimulující faktor pro granulocyty a makrofágy
GvL	graft versus leukemia effect = reakce štěpu proti leukemii
HIF	hypoxia-inducible factors = hypoxií indukované faktory
HIV	Human Immunodeficiency Virus = virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLA-G	human leukocyte antigen G = lidský leukocytární antigen-G
HS	high sensitivity
HSP90	heat shock protein 90
IAP	inhibitors of apoptosis = inhibitory apoptických proteinů
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IgM (G)	imunoglobulin M (G)
IgVH	mutační stav genů kódujících variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů
IKK	kinázový komplex inhibitoru kappa B
IL	interleukin
IL-1-R	receptor pro interleukin-1
IMiDs	immunomodulating drugs
IW CLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
IκB	inhibitor kappa B
JAK	Janus protein tyrosine kinase
kDa	kilodalton
LAG3	lymphocyte-activation gene 3 = lymfocyty aktivující gen 3
LAK	lymphokine-activated killer cells = lymfokiny aktivovaní zabíječi
LDH	laktátdehydrogenáza
LDT	lymphocyte doubling time = zdvojovací čas lymfocytů
LPL	lipoproteinová lipáza
LT-R	receptor pro lymfotoxin-β
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor = kolonie stimulující faktor pro makrofágy
MDR1	multidrug resistance 1 gene
MDV	mikrovaskulární denzita v kostní dřeni
MEK/ERK	mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase
MMP	matrix metalloproteinase

MRN	minimální reziduální nemoc
mRNA	mediátorová ribonukleotidová kyselina
NCI-WG	National Cancer Institute-Sponsored Working Group = pracovní skupina Národního institutu pro výzkum rakoviny
NF- κ B	nuclear factor kappa B = nukleární faktor kappa B
NK (buňky)	natural killer cells = přirození zabíječi
ORR	overall response rate = celkové léčebné odpovědi
OS	overall survival = celkové přežití
p53	protein p53
PAMPs	pathogen-associated molecular pattern = molekulární znaky asociované s patogenem
PCR	polymerase chain reaction = polymerázová řetězová reakce
PFS	progression-free survival = období bez příznaků nemoci
Ph (chromozom)	Philadelfský (chromozom)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIGs	p53 Induced Genes
PK	periferní krev
PR	partial remission = částečná remise
PS	performance status = výkonnostní stav
r	korelační koeficient
RT-PCR	reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SLL	small lymphocytic lymphoma = malobuněčný lymfom
TCR	receptor pro T-lymfocyty
TFS	treatment-free survival = období bez nutnosti léčby
TGF-beta (β)	transforming growth factor beta (β) = transformující růstový faktor beta (β)
TGF β R	receptor pro transformující růstový faktor- β
TK	thymidin kináza
TNF-alfa (α)	tumor necrosis factor alpha (α) = tumor nekrotizující faktor alfa (α)
TNF-alfa-R	tumor necrosis factor alpha receptor = receptor pro tumor nekrotizující faktor alfa
TP53	gen kódující protein p53
TRADD	TNF α R Associated Death Domains

TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor = s tumor nekrotizujícím faktorem asociované faktory
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TTT	time to treatment = období do zahájení léčby
UZ	ultrasonografické
VEGF	vascular endothelial growth factor = cévní endotelový růstový faktor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
ZAP-70	zeta-asociovaný protein o 70 kilodaltonech

2. Úvod

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastějším typem leukemie v západní populaci (1). I přes svoji vysokou incidenci zůstávala CLL po velmi dlouhou dobu onemocněním, které na rozdíl od jiných lymfoproliferací příliš nepoutalo pozornost. V několika posledních letech se pohled na tuto chorobu podstatně změnil a díky intenzivnímu studiu byly učiněny zásadní objevy v oblasti patogeneze, prognostických faktorů i léčby se zavedením účinných intenzivních léčebných postupů. Chronická lymfocytární leukemie je onemocnění s extrémně variabilním klinickým průběhem – zatímco třetina nemocných léčbu nikdy nevyžaduje, další třetina nemocných progreduje v čase s nutností zahájení léčby a třetina pacientů vyžaduje léčbu ihned po stanovení diagnózy (2, 3, 4). Vzhledem k neustále se zvyšující incidenci onemocnění znamenají zmíněné 2/3 nemocných značné náklady, které je třeba vynaložit na diagnostiku a léčbu včetně prevence a léčby infekčních komplikací, které jsou pro toto onemocnění typické a jejichž výskyt se zvyšuje i při použití intenzivních léčebných postupů. Tím představuje CLL nejen ryze medicínský, ale také sociální a finanční problém.

Trendem u CLL se v posledních letech stalo preciznější stanovení a zpřesnění prognózy. Dnes již víme, že použití klasických prognostických faktorů, zejména systémů klinické klasifikace dle Raie a Bineta, je ke stanovení individuální prognózy nemocných s CLL nedostatečné, což platí zejména pro pacienty v časných klinických stádiích. I tito nemocní mohou totiž velmi rychle progredovat a mít agresivní průběh onemocnění. Právě u nemocných v časných stádiích je nejvíce patrná výrazná heterogenita v klinickém průběhu nemoci v rámci stejného stádia (1, 3). I když byl již objevením některých nových faktorů, díky kterým je už v době stanovení diagnózy možné rozdělit nemocné do skupin významně se lišících prognózou, učiněn významný pokrok, hledání nových ukazatelů stále pokračuje. Díky dalšímu zpřesnění individuální prognózy se nabízí i možnost načasování a přizpůsobení intenzity léčby individuálnímu riziku nemocného (3, 5).

Z cirkulujících cytokinů, které sehrávají důležitou roli v patogenezi a biologickém chování maligního klonu a jsou často zmiňovány v souvislosti s poruchou apoptických drah, proliferací a angiogenezí u CLL, a u nichž lze na základě literárních údajů předpokládat prognostický význam, je třeba jmenovat zejména tumor nekrotizující faktor-alfa (TNF- α), transformující růstový faktor-beta (TGF- β) a jeho receptory a fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2) a jeho receptory (6, 7, 8, 9, 10, 11). Právě těmto ukazatelům je v disertační práci věnována pozornost.

3. Chronická lymfocytární leukemie – teoretický úvod

3.1 CLL obecně

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastějším leukemickým onemocněním dospělých v euroamerické populaci (12). Jde o lymfoproliferativní onemocnění, které dle aktuální klasifikace Světové zdravotnické organizace tvoří společnou jednotku s lymfomem z malých lymfocytů (small lymphocytic lymphoma, SLL) (13). Hranice mezi diagnózou CLL a SLL je arbitrární - absolutní počet lymfocytů v periferní krvi $5 \cdot 10^9/l$. Hodnoty lymfocytů nad $5 \cdot 10^9/l$ jsou vedle typické morfologie a fenotypu buněk jedním z nutných kritérií pro stanovení diagnózy CLL, která je založena na NCI-WG (National Cancer Institute-sponsored Working Group) kritériích (revidovaných v roce 2008) (Tab. 1) (14, 15). Medián věku nemocných s CLL se pohybuje mezi 65-72 lety, necelá třetina pacientů je však v době stanovení diagnózy mladší 55 let. Muži jsou postiženi častěji než ženy, a to v poměru 2:1 (16, 17). V posledních 15 letech došlo u CLL ke značnému nárůstu zásadních poznatků v oblasti patogeneze, prognostických faktorů a léčby.

Tab. 1. Diagnostická kritéria CLL dle National Cancer Institute-sponsored Working Group (NCI-WG) (15) .

Morfologicky zralé B-lymfocyty v periferní krvi (PK) $> 5000/mm^3$, < 55 % atypických buněk v PK Typický imunofenotyp (CD 5/19/20/23+, sIg slabě +, FMC7-)

3.1.1 Změna pohledu na CLL v posledních letech

Zatímco dříve byla CLL považována za onemocnění starší populace, dnes již víme, že téměř třetina nemocných je v době stanovení diagnózy mladší 55 let (16). Tento fakt s sebou přináší nutnost zavedení moderních intenzivních léčebných postupů. U těchto nemocných byl prokázán neoddiskutovatelný přínos imunochemoterapie založené na purinových analogích a monoklonálních protilátkách, schopných dosáhnout kompletní remise i odstranění minimální reziduální choroby. Paliativní léčba představovaná především chlorambucilem, která byla doménou do 90. let 20. století, je tak v současné době vyhrazena pouze pro nemocné, kteří vzhledem k vysokému věku, špatnému celkovému stavu či závažným přidruženým

onemocněním nejsou schopni podstoupit léčbu intenzivní (18). Jedinou léčebnou možností skýtající reálnou šanci na vyléčení CLL je alogenní transplantace krvetvorných buněk. Ta však může být provedena pouze u vysoce selektované skupiny mladších nemocných s nepříznivým klinickým průběhem, kteří jsou jinak ve velmi dobrém klinickém stavu (19, 20, 21).

Další pokroky u CLL se udály i na poli patogeneze. Původní představa, že v patogenezi CLL hraje hlavní roli pouhá pasivní akumulace leukemických lymfocytů v G0 fázi buněčného cyklu v důsledku poruchy geneticky řízené buněčné smrti - apoptózy, byla poopravena zjištěním, že maligní lymfocyty CLL mají také nezanedbatelný proliferační potenciál (22). Množení leukemických buněk se odehrává v proliferačních centrech mízních uzlin či kostní dřeně. Populace B-lymfocytů se tak může zvýšit až o 0,35 % denně. Takové případy CLL s vystupňovanou proliferací vykazují klinicky agresivnější průběh (4, 23). Jednou z nejdůležitějších signálních drah vedoucích k proliferaci maligních buněk je signální dráha nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B). Je však nutno dodat, že stálá aktivace NF- κ B u CLL nevede pouze ke zvýšené proliferaci, ale expresí některých molekul s anti-apoptickým působením také umocňuje nevnímavost leukemických buněk vůči pro-apoptickým stimulům (24, 25) (dále viz. kapitola 4.1 Signální dráha nukleárního faktoru kappa B a její význam u CLL). Další takovou dráhou konstitutivně aktivovanou u CLL je dráha fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K). PI3K aktivuje proteinovou kinázu Akt (označovanou také jako proteinová kináza B; PKB), jejíž hlavní funkcí je inhibice apoptózy nejrůznějšími mechanismy (například zabraňuje snížení exprese anti-apoptických proteinů Bcl-X_L a XIAP [X-linked inhibitor of apoptosis]) (24, 26, 27).

Nové poznatky byly učiněny i při objasňování role různých apoptických mechanismů v patogenezi CLL. Maligní lymfocyty mají několik možností, jak uniknout programované buněčné smrti a dnes je již známo několik cest přispívajících k poruše apoptózy. Jednou z nejdůležitějších je působení anti-apoptických proteinů rodiny Bcl-2, konkrétně proteinů Bcl-2 a Mcl-1, jejichž zvýšená exprese byla u CLL prokázána (26, 28). Zvýšená exprese Bcl-2 proteinu byla zaznamenána u více než 80 % případů CLL. Na rozdíl od folikulárního lymfomu, u kterého byl jako první Bcl-2 popsán a u kterého je jeho nadměrná exprese důsledkem typické translokace t(14;18), dochází u CLL k nadprodukci Bcl-2 jinými mechanismy. Mezi nejdůležitější patří například hypometylace promotorových oblastí tohoto genu (29). Bcl-2 brání rozvoji apoptózy různými cestami, například inhibicí kaspáz, ovlivněním regulace hladiny intracelulárního kalcia a mitochondriálního membránového

potenciálu, či tvorbou nefunkčních heterokomplexů s adaptorovými proteiny TRADD (TNF α R Associated Death Domains), FADD (Fas Associated Death Domains) (viz. dále) a také s proteinem Bax. Protein Bax je důležitým pro-apoptickým proteinem, jehož exprese je regulována signální dráhou p53, která je u CLL často narušena. Ale i v případech neporušené funkce genu TP53 a neporušené dráhy proteinu p53 však u CLL pro-apoptická funkce Bax selhává, a to právě v důsledku tvorby nefunkčních heterokomplexů s Bcl-2. U CLL byl také zaznamenán zvýšený poměr Bcl-2/Bax. Vyšší hladiny proteinů Bcl-2, Mcl-1 či zvýšený poměr Bcl-2/Bax jsou u CLL spojeny s agresivnějším průběhem onemocnění, horší odpovědí na léčbu včetně purinových analog a kratším celkovým přežitím (24, 26). Experimentálně již byly u CLL využity inhibitory Bcl-2, například navitoclax, Bcl-2 antisense oligonukleotid oblimersen či arsenic trioxid přímo brzdící expresi a produkci Bcl-2 (30, 31). Dalším mechanismem úniku CLL buněk před apoptózou jsou defekty v signálních drahách spouštěných „death“ receptory, jako jsou Apo/Fas-1 (CD95) a TRAIL 1 a 2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand), které jsou součástí tzv. vnější cesty apoptózy (24, 32). Apo/Fas-1 a TRAIL patří do rodiny TNF- α receptorů, po navázání ligandu dochází k jejich aktivaci spojené s konformační změnou C-konců cytoplazmatických „death domains“ (DD) a spuštění nitrobuněčné signalizace, v níž jsou zapojeny proteiny FADD a TRADD. Protein FADD je poté schopný přímo vázat iniciační proteinázu kaspázové kaskády vnější cesty, a to kaspázu 8. Kaskádovitá aktivace dalších kaspáz vede dále ke zvýšení permeability mitochondriálních membrán a uvolnění pro-apoptických působků s následným zánikem buňky (32). Tato vnější cesta apoptózy je u CLL narušena, neboť lymfocyty CLL jsou vůči Fas a TRAIL indukované apoptóze odolné (24, 26). U CLL je však narušena i tzv. vnitřní cesta apoptózy, která je představována zejména aktivací signální dráhy proteinu p53. Za normálních okolností indukuje aktivovaný p53 transkripci příslušných genů zapojených do apoptických pochodů, a to proteinu p21 (blokátor cyklin dependentní kinázy) brzdícího buněčné dělení a růst, proteinů Bax, Apo/Fas-1 a PIGs proteinů (p53 Induced Genes) určených k tvorbě oxidativního stresu (32). Jak již bylo řečeno, dráha p53 je u některých nemocných s CLL narušena (delecí 17p13 a/nebo mutací TP53 – viz. kapitola 3.2.2 Nové prognostické faktory) a tito nemocní mají nejhorší prognózu s nedobrou odpovědí na purinová analoga a nejkratší celkové přežití (33, 34).

Z dalších molekul s anti-apoptickým působením zvýšeně exprimovaných u CLL je třeba jmenovat inhibitory apoptických proteinů IAP (inhibitors of apoptosis) a s tumor nekrotizujícím faktorem asociované faktory TRAF 1 a 2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor). Mechanismem působení IAP, které jsou pozitivně transkripčně regulovány dráhou NF- κ B, je

přímá inhibice některých kaspáz. Proteiny TRAF jsou součástí signalizační cesty TNF- α . TRAF indukují fosforylaci inhibitoru kappa B (I κ B) následovanou aktivací NF- κ B vedoucí k transkripci cílových genů včetně TNF- α s následným uplatněním jeho anti-apoptické funkce na maligní lymfocyty CLL (26, 35).

Při studiu patogeneze CLL je v posledních letech věnována značná pozornost také angiogenezi. Angiogeneze se podílí na progresi CLL zvýšeným přísunem živin i ochranou proti apoptóze (24) (viz. kapitola Další nové prognostické faktory).

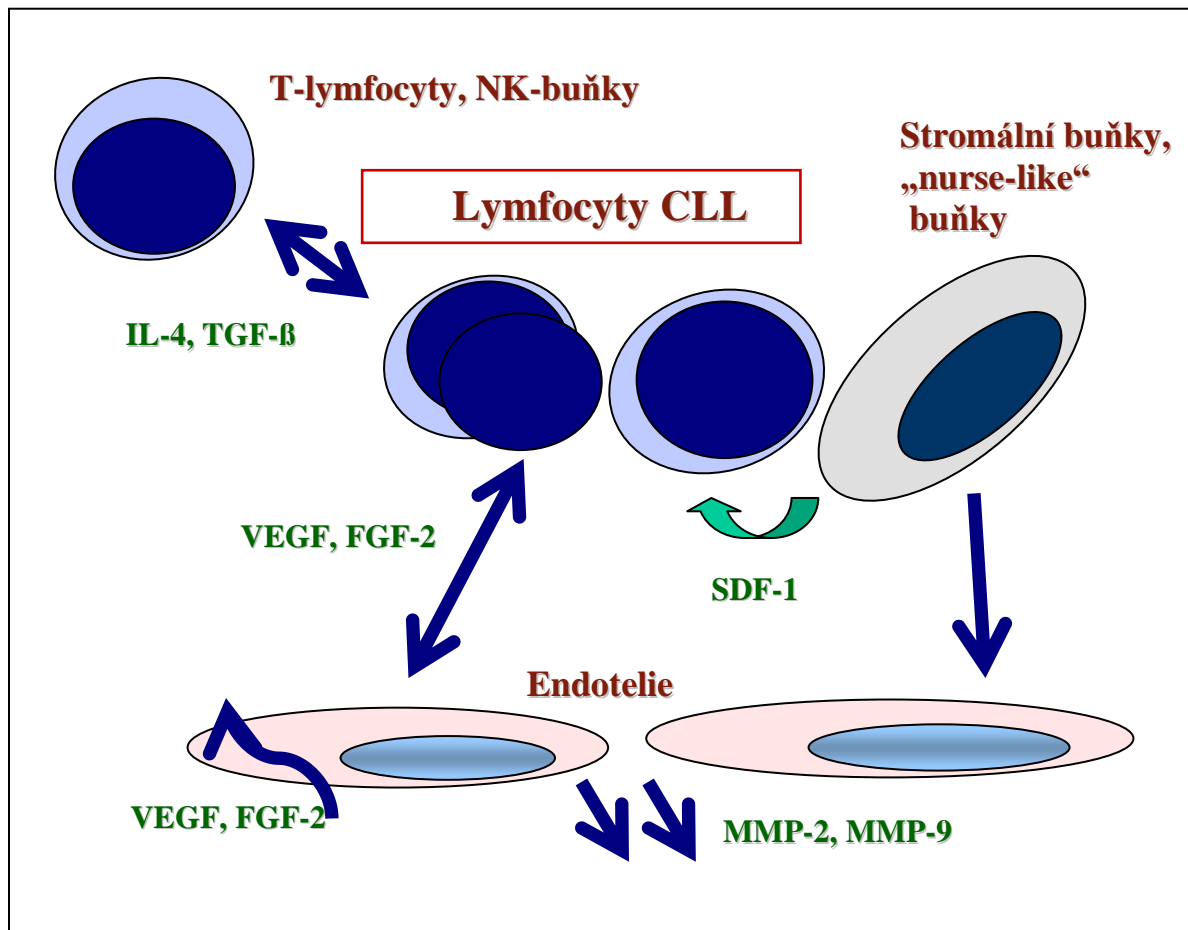
Zajímavým nálezem je fakt, že maligní lymfocyty CLL jsou odolné vůči apoptóze *in vivo*, jsou však velmi náchylné k apoptóze *in vitro*. Toto zjištění lze vysvětlit interakcemi leukemických buněk s T-lymfocyty, makrofágy, stromálními a dendritickými buňkami, „nurse-like“ buňkami a endoteliemi v mikroprostředí kostní dřeně, lymfatických uzlin a sleziny. K signalizaci mezi leukemickými lymfocyty a buňkami mikroprostředí dochází jak přímými mezibuněčnými kontakty, tak i prostřednictvím nejrůznějších rozpustných signálních molekul a cytokinů vylučovaných maligními buňkami i buňkami mikroprostředí, a to včetně FGF-2, vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), TGF- β a mnoha dalších (24, 27, 30, 36) (Obr. 1). Signály mezi těmito buněčnými elementy také kromě ochrany proti apoptóze zvyšují proliferační potenciál leukemických lymfocytů. Maligní B-lymfocyty poté migrují z těchto proliferačních center mikroprostředí dřeně a uzlin do periferní krve, kde se již dále nedělí (24, 30). Důležitost role mikroprostředí v apoptických, proliferačních i angiogenních dějích u CLL, a tím i její patogenezi, je tedy neoddiskutovatelná.

Velké pokroky byly také zaznamenány při studiu prognostických faktorů. Nové prognostické faktory dnes výrazně napomáhají zpřesnit prognózu nemocných s CLL (včetně pacientů v časných klinických stádiích), a mohou tak lépe předpovědět průběh onemocnění již v době stanovení diagnózy (2, 3, 37).

Obrázek 1. Role mikroprostředí u CLL

Interakce leukemických CLL buněk s T-lymfocyty, NK-buňkami, stromálními a „nurse-like“ buňkami a endoteliemi v mikroprostředí kostní dřeně, sleziny a lymfatických uzlin. Převzato a upraveno dle Smolej, L., Význam mikroprostředí u chronické lymfocytární leukemie. 2010.

(24)



MMP - Matrix metalloproteinase, SDF-1 - Stromal cell-derived factor-1

3.2 Prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie – teoretický úvod

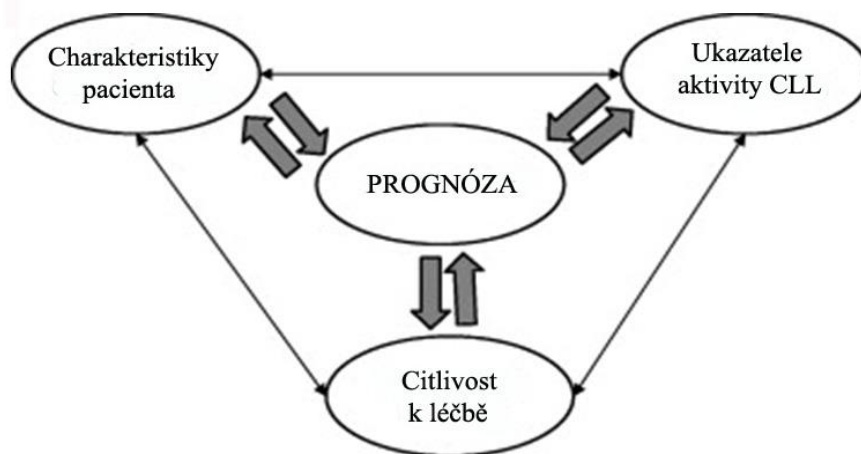
Chronická lymfocytární leukemie je onemocnění s mimořádně různorodým klinickým průběhem a prognózou. Zatímco někteří pacienti s CLL nikdy nevyžadují léčbu a žijí stejně dlouho jako jejich zdraví vrstevníci, jiní nemocní mají agresivní klinický průběh s časnou nutností léčby a výrazně zkráceným přežitím. Celkové přežití pacientů s CLL tak kolísá od 1-2 let po více než 25 let (1, 4). Po dlouhou dobu byly hlavními ukazateli prognózy a celkového přežití pacientů s CLL dva nezávisle vyvinuté stážovací systémy dle Raie (1975) a Bineta (1981) (38, 39) (viz dále). Dnes je však zřejmé, že ke stanovení individuální prognózy

nemocného s CLL je třeba posoudit několik hledisek. Je nutné přihlídnout jednak k charakteristikám týkajících se pacienta (věk, pohlaví, výkonnostní stav a přidružená onemocnění), další výpovědní hodnotu poskytují ukazatele aktivity CLL jako je klinické stádium, rozsah nádorové masy, biologická povaha a v neposlední řadě poskytuje informace o prognóze pacienta také senzitivita k podané léčbě (Obr. 2). Dosažení kompletní remise s negativitou minimální reziduální nemoci (MRN) je považováno za velmi důležitý prognostický ukazatel. Pacienti v kompletní remisi s MRN negativitou mají delší období dogrese i celkové přežití než pacienti s přítomností MRN. Tento poznatek je však nutné ověřit v prospektivních studiích (4, 30, 40). Klinické stážovací systémy jsou tedy pouze součástí komplexního hodnocení prognózy u CLL (4).

Z praktického hlediska lze prognostické faktory u CLL rozdělit do dvou skupin, a to na klasické a nové.

Obrázek 2. Komplexní hodnocení prognózy nemocných s CLL

Zohlednění základních hledisek při stanovení individuální prognózy nemocného s CLL. Převzato a upraveno dle Moreno, C., et al., New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. 2008 (4).



3.2.1 Klasické prognostické faktory

Mezi klasické prognostické faktory u CLL patří klinické stádium, věk, pohlaví a výkonnostní stav pacienta (performance status, PS), ukazatele proliferační aktivity onemocnění, sérové markery a typ infiltrace kostní dřeně.

Stagingové systémy dle Raie a Bineta určující klinické stádium

Modifikovaná Raiova a Binetova klasifikace dělí nemocné s CLL do tří skupin lišících se prognózou a celkovým přežitím (39, 41) (Tab. 2, Tab. 3). Pacienti ve stádiu 0 dle Raie a A dle Bineta tvoří skupinu s nízkým rizikem a nejdelším celkovým přežitím (více než 10 let). Skupinu pacientů s intermediární prognózou tvoří nemocní ve stádiu I a II dle Raie a B dle Bineta. Celkové přežití těchto nemocných je 5-7 let. Nejrizikovější skupinu s nejhorší prognózou představují nemocní ve stádiu III a IV dle Raie a C dle Bineta. Celkové přežití je v této skupině kratší než 3 roky (37, 39, 41, 42).

Tab. 2. Staging CLL podle Raie.

Dle modifikovaného třístupňového stagingu je stádium nízkého rizika 0, středního I/II a vysokého III/IV (41).

Stádium	Definice
0	Lymfocytóza
I	Lymfadenopatie
II	Hepatomegalie a/nebo splenomegalie
III	Anémie - hemoglobin < 110 g/l
IV	Trombocytopenie - trombocyty < 100.10 ⁹ /l

Tab. 3. Staging CLL podle Bineta.

Za 1 oblast jsou počítány uzliny krční, axilární, mediastinální, retroperitoneální a tříselné, játra a slezina. Oboustranné postižení je počítáno jako jedna oblast (39).

Stádium	Definice
A	Méně než 3 postižené lymfatické oblasti
B	3 a více postižených lymfatických oblastí
C	Anémie - hemoglobin < 110 g/l a/nebo trombocytopenie - trombocyty < 100.10 ⁹ /l

Raiova i Binetova klasifikace však mají několik zásadních nedostatků:

Jedním z nich je fakt, že nemocní jsou do jednotlivých stádií řazeni pouze na základě vyšetření krevního obrazu a fyzikálního vyšetření hmatných uzlin, jater a sleziny. Zvětšení

vnitřních uzlin (u CLL se jedná zejména o uzliny v retroperitoneu, mediastinální lymfadenopatie je méně častá) či splenomegalie zjištěné při použití zobrazovacích vyšetření nejsou při stážování nemocných zohledněny, neboť nebyly v době zavedení těchto stagingových systémů dostupné (43). Několik prací však již prokázalo, že použití zobrazovacích metod může mít u CLL svoje opodstatnění, a to jak v diagnostice a zpřesnění prognózy, tak i v hodnocení léčebné odpovědi a že revize dosavadních stagingových systémů by byla vhodná (16, 43, 44, 45). Jiné práce ale význam zobrazovacích metod u CLL nepotvrdily (46, 47). Muntañola et al. demonstrovali, že nemocní ve stádiu 0 dle Raie s břišní lymfadenopatií prokázanou počítačovou tomografií (CT) měli významně kratší období do progresu (progression free survival, PFS) a vyžadovali časnější zahájení léčby než nemocní s normálním nálezem na CT; v celkovém přežití (overall survival, OS) rozdíl nalezen nebyl. Nebyl také rozdíl v PFS mezi nemocnými ve stádiu Rai 0 s abnormálním abdominálním CT a nemocnými ve stádiu I dle Raie (43). Práce švédských autorů prokázala, že použití CT mění u části nemocných původně nízká klinická stadia na pokročilejší (pro nový nález lymfadenopatie a/nebo splenomegalie v porovnání s klinickým vyšetřením). Dále nález masivní lymfadenopatie dle CT významně koreloval s kratším obdobím do zahájení léčby druhé linie, na celkové přežití vliv neměl. Významný rozdíl v období do zahájení léčby druhé linie i celkovém přežití byl zaznamenán u nemocných se splenomegalií zjištěnou dle CT v porovnání s nemocnými bez splenomegalie. Lymfadenopatie a splenomegalie zjištěné na CT tedy dle této studie predikují trvání léčebné odpovědi po léčbě 1. linie. Použití CT vyšetření po skončení léčby také změnilo u části nemocných původně dobré léčebné odpovědi (kompletní remise, CR) na méně příznivé (parciální remise, PR). Nemocní, kteří dosáhli CR dle CT vyšetření, měli navíc delší období do další terapie v porovnání s CR hodnocenou dle NCI-WG kritérií (kritéria založená vedle hodnocení krevního obrazu a biopsie kostní dřeně pouze na fyzikálním vyšetření) (15, 16). Ve studii porovnávající efekt fludarabinu s kombinací fludarabinu s cyklofosfamidem bylo zaznamenáno významně nižší procento celkových léčebných odpovědí (overall response rate, ORR) a CR při použití zobrazovacích metod (CT či ultrasonografického vyšetření; UZ) v porovnání s fyzikálním vyšetřením (44). Smolej et al. na rozsáhlé retrospektivní studii 301 nemocných s CLL prokázali, že nemocní s vnitřní lymfadenopatií zjištěnou dle CT či UZ mají významně kratší celkové přežití. Kratší přežití měli i nemocní s masivní lymfadenopatií, u nichž ale nedosáhlo statistické významnosti (45). Data ze tří randomizovaných studií fáze 3 (CLL4, CLL5, CLL8) byla zpracována ve studii Eichhorsta et al. Hodnocen byl zejména význam masivní lymfadenopatie (tzv. bulk, zde definován jako uzliny většího průměru než 5 cm) zjištěné dle CT či UZ. Nebyl

zaznamenán rozdíl v procentech dosažených ORR u nemocných s bulkem a bez bulku, významně vyšší procento CR měli ale nemocní bez masivní lymfadenopatie. Rozdíl v PFS a OS mezi těmito dvěma skupinami nebyl nalezen. Při hodnocení nemocných ze všech tří studií měli pacienti, kteří dosáhli CR dle CT vyšetření, významně delší PFS v porovnání s CR dle NCI-WG a IWCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia) kritérií (založených na fyzikálním vyšetření). Při analýze jednotlivých studií tento rozdíl v PFS nebyl prokázán u studie CLL8 hodnotící přínos imunochemoterapie FCR (fludarabin, cyklofosamid, rituximab), která je v současné době léčbou 1. volby (viz. dále). Výstupem této práce je tedy závěr, že použití zobrazovacích metod pro určení prognózy u nemocných před léčbou nemá význam. Eichhorst doporučuje provedení zobrazovacích metod pouze před léčbou alemtuzumabem (u nemocných s uzlinami většími než 5 cm má alemtuzumab menší léčebný efekt, a je tedy vhodné zvolit jiný léčebný postup) a před alogenní transplantací kostní dřeně (15, 34, 47). Ani práce Bluma et al. přínos CT vyšetření u CLL nepotvrdila. Při použití CT vyšetření bylo sice zaznamenáno méně CR a PR než dle NCI-WG kritérií, PFS však nebylo rozdílné u nemocných, jejichž léčebná odpověď byla hodnocena na základě fyzikálního vyšetření v porovnání s odpovědí dle CT vyšetření s nálezem vnitřní lymfadenopatie (46).

S použitím zobrazovacích metod velmi úzce souvisí i prognostický význam masivní lymfadenopatie, tzv. bulku, neboť je velmi často lokalizována nitrobřišně, a zjištělná tedy pouze na základě UZ či CT vyšetření. Ve většině studií je definována jako paket uzlin mající 5 a více cm v průměru (16, 43, 45, 47). Smolej et al. na rozsáhlém souboru nemocných (n = 301) zjistili rozvoj masivní lymfadenopatie v průběhu CLL až u 28 % nemocných; daleko častěji byly zvětšeny vnitřní (zejména nitrobřišní) uzliny v porovnání se zevními (45). Některé práce prokázaly, že nemocní s masivní lymfadenopatií dosahují po léčbě významně nižších procent CR a mají kratší PFS, naznačen byl i trend směrem ke kratšímu OS (16, 45, 47). Masivní lymfadenopatie je také spojena s nepříznivou cytogenetickou aberací delecí 11q (viz. dále) (33, 42, 48, 49). U nemocných s CLL po alogenní transplantaci byla lymfadenopatie 5 a více cm (nikoliv cytogenetické nálezy) hlavním faktorem předpovídajícím riziko relapsu. Naopak nejvyšší pravděpodobnost 5-ti letého přežití po transplantaci měli nemocní s uzlinami pod 5 cm (a bez přidružených onemocnění) (50). K ověření negativního prognostického významu masivní lymfadenopatie je však třeba dalších prospektivních studií. To, zda u CLL zařadit zobrazovací metody do stagingu a hodnocení léčebné odpovědi, tak jak je tomu standardně u ostatních lymfoproliferací, je velmi diskutovanou otázkou. V současné době však není CT vyšetření v rámci běžné péče doporučováno ani k vstupnímu určení

rozsahu onemocnění ani k hodnocení léčebné odpovědi (4, 15). Výjimkou mohou být pacienti zařazení do klinických studií či pacienti, u nichž je podezření na transformaci CLL do obrazu agresivnějšího lymfomu, nejčastěji difúzního B-velkobuněčného lymfomu (Richterův syndrom). Vhodnou alternativou k CT vyšetření je ultrasonografie břicha vzhledem k nízké ceně, dobré dostupnosti a absenci ionizovaného záření, jejíž použití je dle současných doporučení pro diagnostiku CLL možné (15).

Další limitací klasických stagingových systémů je fakt, že není zohledněna příčina cytopenie. Nemocní by měli být zařazení do pokročilého stádia jen v případě, že anémie či trombocytopenie je důsledkem infiltrace kostní dřeně CLL (48). Pacienti s autoimunitní hemolytickou anémií, imunní trombocytopenií či čistou aplázií červené krevní řady jsou však mnohdy do pokročilých klinických stádií řazeni mylně (22, 51). Několik retrospektivních analýz navíc prokázalo, že imunitní příčina cytopenie má významně lepší prognózu (bez nepříznivého vlivu na celkové přežití) než cytopenie způsobené selháním kostní dřeně při infiltraci CLL (51, 52).

Dalším důležitým faktem je, že přežití nemocných s CLL se může i v rámci jednoho klinického stádia výrazně lišit. Tento fakt se týká zejména nemocných v časných klinických stádiích (Binet A, Rai 0), kteří v současné době tvoří většinu nově diagnostikovaných pacientů s CLL. Dosavadní stagingové systémy však nejsou schopny identifikovat ty nemocné v časných stádiích, kteří mají vysoké riziko progresu a celkově špatnou prognózu (1). Bylo proto velkým pokrokem uplatnění nově nalezených prognostických faktorů (viz. dále), které umožňují nemocné zejména v časných stádiích rozdělit do rizikových skupin a tedy již v době stanovení diagnózy pomohou posoudit riziko progresu (5). Nové prognostické faktory tak mohou zpřesnit individuální prognózu nemocného, otázkou do budoucna zůstává i možnost načasování a přizpůsobení intenzity léčby individuálnímu riziku (tzv. risk-adapted strategies) (5, 53). I když v tomto ohledu klasické stagingové systémy dle Raie a Bineta selhávají, jsou pro svoji jednoduchost a snadnou reprodukovatelnost v klinické praxi stále užívány, a to nejen k orientačnímu odhadu prognózy pacienta, ale jsou i součástí kritérií pro zahájení léčby (15, 54).

Věk, pohlaví a výkonnostní stav

Pohlaví a věk pacienta mají také svůj prognostický význam. Muži s CLL mají zpravidla agresivnější onemocnění a kratší přežití než ženy, tento fakt ale zůstává stále neobjasněn (55). Věk jako prognostický faktor u CLL je spojen s určitými zvláštnostmi. Starší pacienti mají

sice absolutní přežití kratší než pacienti mladší, relativní přežití mají však delší (56). Věk není v současné době zahrnutý do kritérií pro zahájení léčby, je nutno jej však stejně tak jako celkový výkonnostní stav vždy zohlednit, neboť zejména u starších nemocných významně stoupá výskyt přidružených onemocnění, která mohou bránit použití razantnějších léčebných postupů. V rozsáhlé studii Wierdy et al. s 1674 nemocnými s CLL byl věk jedním z nejsilnějších faktorů ovlivňující celkové přežití (nejkratší přežití měli nemocní nad 65 let v porovnání s nemocnými pod 50 let) (57).

Ukazatele proliferační aktivity onemocnění, sérové markery

Jednoduchým markerem proliferace u CLL je tzv. zdvojovací čas lymfocytů (lymphocyte doubling time, LDT). Jde o časový úsek, za který dojde k nárůstu lymfocytů v periferní krvi na dvojnásobek původní hodnoty (37). Montserrat et al. poprvé popsal význam LDT pro predikci celkového přežití. Zdvojovací čas lymfocytů kratší než 12 měsíců je u časných stádií (Rai 0-II, Binet A) spojen s horší prognózou a kratším přežitím. Pokud je naopak LDT delší než 12 měsíců, onemocnění má příznivější průběh (58). Zdvojovací čas lymfocytů nižší než 6 měsíců či nárůst absolutního počtu lymfocytů (absolute lymphocyte count, ALC) o 50 % za dobu kratší 2 měsíců patří mezi kritéria zahájení léčby (15, 48). Samotný absolutní počet lymfocytů není ale při rozhodování o zahájení léčby relevantní. Jde o ukazatel, který odráží velikost nádorové masy a má prognostický význam (4, 40, 57, 59, 60, 61). V nedávné studii D'Arena et al. koreloval vyšší ALC s kratším obdobím do zahájení léčby 1. linie u pacientů ve stádiu 0 dle Raie (60). V již citované studii Wierdy et al. byl ALC jedním z nejvýznamnějších nezávislých prognostických faktorů ve vztahu k celkovému přežití (ALC nad $20 \cdot 10^9/l$) a stal se součástí nově navrženého prognostického indexu u dosud neléčených nemocných s CLL (vedle věku, pohlaví, beta 2-mikroglobulinu, Rai stádií a počtu postižených lymfatických uzlin). Je však nutno dodat, že význam ALC byl prokázán pouze u nemocných mladších 65 let (57). Platnost tohoto indexu navrženého s cílem zpřesnění individuální prognózy nemocných s CLL již v době stanovení diagnózy (včetně nemocných v časných stádiích CLL) byla ověřena i v dalších studiích (pro predikci celkového přežití i období do zahájení léčby), v nichž ALC koreloval s kratším přežitím, nebyl ale nezávislým prognostickým ukazatelem (62, 63). Naopak studie Molicy et al. potvrdila roli ALC jako nezávislého prognostického faktoru se vztahem k období do zahájení léčby první linie u nemocných A dle Bineta (61). Mezi další ukazatele aktivity CLL lze zařadit skupinu sérových markerů. Jde zejména o laktátdehydrogenázu (LDH), beta 2-mikroglobulin (B2M), solubilní CD23, CD27 a CD44, sérovou thymidin kinázu (TK) a některé interleukiny. Zvýšené hodnoty těchto markerů často

koreluje s agresivnějším průběhem onemocnění a s ostatními nepříznivými faktory, kterým bude věnována pozornost v dalších kapitolách (viz. kapitola 3.2.2 Nové prognostické faktory) (3). Mnohdy je však obtížné nálezy interpretovat vzhledem k použití rozdílných, nestandardizovaných metod detekce. Problémem v mnohých studiích je také stanovení rozdílné hranice („cut-off“) pro zvýšené hodnoty (37).

Zvýšená hladina LDH je u CLL spojena s kratším celkovým přežitím, častějším výskytem delece 17p, s pozitivitou zeta-asociovaného proteinu o molekulové hmotnosti 70 kilodaltonů (kDa) (ZAP-70) a CD38 (3). Zvýšená koncentrace B2M u CLL koreluje s pokročilým klinickým stavem, objemnou lymfadenopatií, významnou infiltrací kostní dřeně, pozitivitou ZAP-70 a CD38 (3, 64). V několika studiích byl B2M nezávislým faktorem predikujícím celkové přežití (57, 62, 63). V některých pracech byla jeho vysoká koncentrace spojena i se zvýšením solubilního CD23 (65). Dvě prospektivní studie ukázaly, že solubilní forma CD23 v séru koreluje s horší prognózou včetně pacientů v časném stádiu A dle Bineta (42). Sérová tymidin kináza je enzym nezbytný pro syntézu DNA, u pacientů s CLL je považována za důležitý marker proliferace a koreluje s pokročilým klinickým stádiem a rychlejší progresí onemocnění u pacientů v časných stádiích CLL. Jako ukazatel aktivity onemocnění je TK používána zejména německou CLL skupinou (66, 67).

V klinické praxi se v podmínkách České republiky rutinně vyšetřuje sérový B2M a LDH, eventuálně TK, vyšetření ostatních sérových ukazatelů je výzkumnou záležitostí.

Typ infiltrace kostní dřeně

V současné době není nutné ke stanovení diagnózy CLL cytologické ani histologické vyšetření kostní dřeně. Histologické vyšetření kostní dřeně a určení typu infiltrace (difúzní vs. nedifúzní typ) bylo dříve považováno za důležitý prognostický faktor. Difúzní infiltrace dřeně CLL buňkami je spojena s horší prognózou a agresivnějším klinickým průběhem (68). Prognostický význam typu infiltrace kostní dřeně však může být nahrazen moderními prognostickými ukazateli (37). V současné době je toto vyšetření vyhrazeno zejména pro pacienty zařazené do klinických studií či v rámci diferenciální diagnostiky závažných cytopenií.

3.2.2 Nové prognostické faktory

Objev několika tzv. nových prognostických faktorů u CLL umožnil získat daleko přesnější informaci o biologickém chování onemocnění a pomohl i upřesnit individuální prognózu

nemocných s CLL. Nejvýznamnějšími z této skupiny jsou cytogenetické abnormality, mutační stav genů pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů (IgVH), exprese ZAP-70 a exprese povrchového znaku CD38 na buňkách CLL (42).

Cytogenetické aberace

Pro chronickou lymfocytární leukemii je ve většině případů typická přítomnost klonálních chromozomálních změn v B-lymfocytech. Klasické cytogenetické vyšetření je u CLL méně výtěžné (40-50 %) pro velice nízkou mitotickou aktivitu leukemických lymfocytů *in vitro* a možné falešně pozitivní výsledky způsobené záchytem aberací v příměsi nenádorových T-lymfocytů (1, 69). Pokrokem v detekci cytogenetických změn bylo zavedení metody fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH), kterou lze zjistit přítomnost cytogenetických aberací až v 80 % případů a která se v současné době stala nezastupitelnou rutinní metodikou u pacientů s CLL (12). Nejvýznamnějšími nálezy u CLL jsou delece dlouhého ramene 13. chromozomu (del 13q14), trisomie 12, delece části dlouhého ramene 11. chromozomu (del 11q) a delece krátkého ramene 17. chromozomu (del 17p13). Ostatní chromozomové změny mají u CLL spíše omezený význam (například delece 6q) (70). Jednou ze stěžejních prací týkající se problematiky cytogenetických aberací u CLL byla studie publikovaná v roce 2000 Döhnerem et al. Pomocí FISH zjišťoval aberace u 325 pacientů s CLL. Určil četnost jejich výskytu a nálezy koreloval s klinickými parametry a průběhem onemocnění. Na základě cytogenetických nálezů definoval 5 skupin lišících se statisticky významně celkovým přežitím. Nejdelší celkové přežití a tedy nejlepší prognózu měli nemocní s izolovanou delecí 13q14 (celkové přežití 133 měsíců); do skupiny s nejkratším přežitím a tedy nejhorší prognózou patřili nemocní s izolovanou delecí 17p13 (celkové přežití 32 měsíců) (Tab. 4). Tito nemocní měli také nejkratší interval do zahájení léčby (71).

V současné době lze na základě cytogenetických aberací určit 3 prognostické skupiny. První představuje skupinu příznivých aberací zahrnující nemocné s normálním karyotypem a izolovanou del 13q14, do skupiny s nepříznivou prognózou patří nemocní s del 11q a del 17p13 [13]. Nemocní s trisomií 12 mají intermediární prognózu, i když někteří autoři ji řadí do skupiny nepříznivých aberací (4, 40, 72).

Tab. 4. Celkové přežití nemocných s CLL v závislosti na cytogenetických aberacích (71).

Abnormalita	Výskyt (%)	Medián přežití (měsíce)
del 13q14	36	133
negativní nález	18	111
+ 12	14	114
del 11q22	17	79
del 17p13	7	32

V průběhu onemocnění se mohou objevovat nové cytogenetické aberace, hovoří se o tzv. klonální evoluci. Zejména přítomnost nové del 11q a/nebo del 17p13 významně zhoršují prognózu nemocného. Vyšetření cytogenetických abnormalit metodou FISH se proto doporučuje nejen v době stanovení diagnózy a zejména před zahájením léčby, ale i v případě klinické progresy onemocnění či před léčbou další linie (37, 69). Vzhledem k náročnosti a vysoké ceně by se však toto vyšetření mělo provádět pouze u pacientů mladších, v jinak celkově dobrém klinickém stavu a před zahájením léčby intenzivní, nikoliv paliativní.

Jednotlivé cytogenetické nálezy mají svoje specifika:

Delece 13q14 je nejčastější aberací s výskytem vyšším než 50 % (42). U této delece zatím nebyl objeven konkrétní nádorový supresorový gen, který by pomohl objasnit patogenezi onemocnění. Pozornost je věnována nálezům dvou mikroRNA genů (miR-15a a miR-16-1) lokalizovaným v oblasti 13q14. Zdá se, že ztráta či snížení exprese těchto genů má vliv na regulaci exprese hlavního anti-apoptického proteinu Bcl-2. Zvýšení exprese Bcl-2 vede ke zvýšené odolnosti buněk vůči pro-apoptickým stimulům a delšímu přežívání buněk CLL (48, 73). Pacienti s izolovanou delecí 13q14 mají nejdelší přežití a excelentní prognózu v porovnání s ostatními aberacemi (4, 22).

Trisomie 12 je druhou nejčastější chromozomální změnou u CLL s výskytem mezi 10-25 %. Ani u této změny nebyl nalezen konkrétní gen vysvětlující patogenezi onemocnění. Buňky CLL s trisomií 12 mají atypickou morfologii a častěji nemutované IgVH geny (viz. dále); zajímavým zjištěním je vysoká exprese CD20 u této aberace, což je důležité pro léčbu antiCD20 monoklonálními protilátkami (3, 48, 74).

Delece 11q se vyskytuje v 10-20 % a spolu s del 17p13 je považována za vysoce nepříznivý nález. Na úrovni DNA (kyselina deoxyribonukleová) je zasažen gen ATM (ataxia teleangiectasia mutated), který hraje důležitou úlohu v signální dráze hlavního pro-

apoptického proteinu p53. Kináza ATM reaguje na poškození buněčné DNA a prostřednictvím fosforylace stabilizuje p53. Narušení této signalizační dráhy vede k poruše apoptózy buněk CLL (33, 42, 48, 75). Ukazuje se, že na rozdíl od p53 (viz. dále) je k uplatnění nepříznivého efektu nutná bialelická ztráta ATM (33). Klinicky je del 11q typicky spojena s predominancí u mužů a častým nálezem masivní lymfadenopatie (periferní, mediastinální i abdominální) (42, 48, 49). Výsledky studie CLL8 však ukazují, že použití razantní imunochemoterapie může nepříznivý vliv delece 11q alespoň částečně setřít (34).

Nejméně příznivým cytogenetickým nálezem u pacientů s CLL je delece krátkého ramene 17. chromozomu (del 17p13). Její výskyt u neléčených pacientů je kolem 5 %, u léčených pacientů se v důsledku klonální evoluce může zvýšit až na 30 % (48). Tato změna je spojena se ztrátou funkce nejvýznamnějšího nádorového supresorového genu p53 (TP53), který sehraává nezastupitelnou úlohu v případě poškození buněčné DNA, kdy za normálních okolností dochází k zástavě buněčného cyklu v G1, G2 fázi a opravě poškozeného genomu či je v případě nevratných změn nastartována signalizační cesta vedoucí k apoptóze. Gen TP53 kódující protein p53 je u CLL nejčastěji poškozen právě delecí 17p13 v kombinaci s mutací druhé alely (kompletní inaktivace genu; bialelické abnormality), ale vyskytují se i samostatné delece a mutace (monoalelické abnormality). Již vyřazení jedné alely delecí vede k porušené funkci proteinu p53. Bylo prokázáno, že stejnou výpovědní hodnotu jako delece mají i samotné mutace TP53 (blíže viz. kapitola 3.2.3 Další nové prognostické faktory) (33, 76). Pacienti s del 17p13 a/nebo mutací TP53 mají nejhorší prognózu s nejkratším celkovým přežitím (33). Jedním z hlavních důvodů je fakt, že účinek většiny protinádorových léků spočívá v indukci apoptózy prostřednictvím signální dráhy p53, která je u pacientů s del 17p13 či mutací TP53 narušena (33, 37). V recentní průlomové studii CLL8 německé skupiny pro CLL, která prokázala přínos kombinované imunochemoterapie (režim FCR) v porovnání se samotnou chemoterapií (režim FC), byla jedinou skupinou, která z FCR zásadně neprofitovala, právě skupina nemocných s del 17p13. U těchto nemocných bylo dosaženo pouze 5 % kompletních remisí (v porovnání s 50 % bez této abnormality) a PSF ani OS nebylo významně delší u režimu FCR na rozdíl od ostatních cytogenetických abnormalit (34). Slibnou léčbu u nemocných s del 17p13 a/nebo mutací TP53 představují léky působící nezávisle na dráze p53 jako monoklonální antiCD52 protilátka alemtuzumab, vysoké dávky kortikoidů či flavopiridol. Nově byl také na pilotním souboru nemocných prokázán přínos kombinace alemtuzumabu s vysokodávkovanými kortikoidy (54, 77, 78, 79). U těchto pacientů by také mělo být časně zváženo provedení alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk, která by mohla negativní prognostický význam del 17p13 či mutace TP53

překonat (50, 80). Přítomnost del 17p13 se tak v současné době stává jediným novým prognostickým faktorem, ke kterému je vhodné přihlídnout při volbě léčebné strategie (48).

Mutační stav genů pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů

Tyto geny jsou fyziologicky hypermutovány u normálních B-lymfocytů po setkání s antigenem v zárodečném centru lymfatické uzliny (12). Dříve se předpokládalo, že B-lymfocyty u CLL jsou buňky, které neprošly zárodečným centrem lymfatického folikulu a odpovídají tzv. naivním B-lymfocytům. Dnes víme, že u asi poloviny pacientů s CLL mají leukemické lymfocyty hypermutované IgVH geny, což by odpovídalo paměťovým buňkám, které prošly zárodečným centrem uzliny (40). Velká studie hodnotící profil genové exprese u CLL však naznačuje, že i lymfocyty s nemutovanými IgVH geny mají profil odpovídající paměťovým buňkám (81). Mutované IgVH geny mají dle definice více než 2% rozdíl vůči sekvenci odpovídající zárodečné linii. Hranice 98 % homologie („cut off“) je v současné považována za nejvhodnější (3, 82). V roce 1999 byl dvěma nezávislými skupinami prokázán prognostický význam mutačního IgVH stavu, dle kterého jsou nemocní s CLL rozděleni do dvou skupin významně se lišících prognózou. Nemocní s nemutovanými IgVH geny mají agresivnější onemocnění, častěji vyžadují terapii a mají významně kratší celkové přežití než nemocní s mutovanými IgVH geny, kteří mají zpravidla stabilní onemocnění (83, 84). Zajímavým zjištěním byl fakt, že tento závěr platí i pro nemocné v časných klinických stádiích (A dle Bineta), u kterých se předpokládalo, že mají příznivou prognózu v porovnání s nemocnými ve stádiích pokročilých. Tento náález jen potvrdil, že klinický staging dle Raie a Bineta není k určení individuální prognózy nemocných zejména v časných stádiích dostačující a že mutační stav IgVH genů a klinický staging jsou dva nezávislé prognostické ukazatele (85). Důležitou výjimkou a také samostatným prognostickým ukazatelem je přítomnost VH3-21 genu, která značí nepříznivou prognózu nezávisle na mutačním stavu (1). Velká pozornost byla věnována souvislosti mutačního IgVH stavu s ostatními prognostickými faktory včetně cytogenetických změn. I když se u pacientů s nemutovanými IgVH geny častěji vyskytují nepříznivé cytogenetické aberace jako del 17p a del 11q a naopak pacienti s mutovanými IgVH geny mají častěji del 13q či normální karyotyp, tento rozdíl není významný a dnes víme, že IgVH mutační stav a cytogenetické aberace jsou nezávislými prognostickými faktory (12, 40). Vzhledem k technické náročnosti a nákladnosti stanovení IgVH (vícekrokový proces zahrnující reverzně transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakci (RT-PCR) s nutností sekvenace PCR produktů) byla před několika lety věnována pozornost hledání tzv. zástupných prognostických faktorů, které by co nejlépe korelovaly s IgVH, ale jejichž

stanovení by bylo snadnější. Nadějnými se zdála být exprese ZAP-70 a CD38 (viz. dále). Mnoho dalších studií poté ale prokázalo diskordanci mezi mutačním stavem IgVH, ZAP-70 a CD38, které jsou nyní považovány za nezávislé prognostické faktory. Stanovení mutačního stavu se však v současné době stalo dostupnějším a spolu s vyšetřením cytogenetických abnormalit je dnes běžně používáno k posouzení prognózy u mladších nemocných s nově diagnostikovanou CLL (3).

Exprese CD38

CD38 je povrchový transmembránový glykoprotein s enzymatickou i receptorovou funkcí. Po navázání ligandu dojde k nitrobuněčné signalizaci následované zvýšenou expresí hlavního anti-apoptického proteinu Bcl-2. Damle et al. porovnávala expresi znaku CD38 na povrchu buněk CLL průtokovou cytometrií s klinickým průběhem a IgVH stavem. Exprese vyšší než 30 % korelovala s nemutovanými IgVH geny (ve více než 92 %) a agresivním klinickým průběhem, nízká exprese byla naopak spojena s mutovanými IgVH geny a delším celkovým přežitím (84). I v několika dalších studiích byla korelace CD38 a mutačního stavu potvrzena a CD38 se tak zdál být nadějným zástupným markerem mutačního stavu (37). Záhy bylo ale zjištěno, že exprese CD38 se může v průběhu onemocnění měnit, velkým problémem byla také rozdílná hranice pro určení pozitivitu CD38 ve většině studií (5 % vs. 7 % vs. 20 % vs. 30 %) (3, 4, 53, 86, 87). Dnes jsou mutační stav IgVH a exprese CD38 považovány za nezávislé prognostické faktory (48, 86, 87). Vyšší exprese CD38 však zůstává důležitým negativním ukazatelem aktivity onemocnění, vyšetření CD38 pomocí průtokové cytometrie může sloužit k upřesnění individuální prognózy nemocných s CLL (53, 87).

Exprese ZAP-70

Zeta-asociovaný protein o molekulové hmotnosti 70 kilodaltonů (ZAP-70) je cytoplazmatická molekula patřící do rodiny tyrosinových kináz Syk. Fyziologicky je exprimován T-lymfocyty a NK-buňkami (natural killer cells), dle nových poznatků také v nízkých koncentracích aktivovanými B-lymfocyty periferní krve, tonsil či sleziny (37). Za normálních okolností je ZAP-70 aktivován zeta podjednotkou T-lymfocytárního receptoru s následným spuštěním signálních nitrobuněčných drah nezbytných pro aktivaci T-lymfocytů. U CLL k aktivaci ZAP-70 vede signální dráha z membránového receptoru B-lymfocytů. ZAP-70 je navíc funkčně propojen se systémem CD38. ZAP-70/CD38 pozitivní lymfocyty mají zvýšenou tendenci k migraci do výhodného mikroprostředí po stimulaci CXCL12 (významný chemoatraktant pro T-lymfocyty). V signální dráze CD31/CD38/ZAP-70 se tedy zřejmě spojují proliferační a

migrační signály. Zvýšenou migrací a proliferací lze vysvětlit agresivnější klinický průběh u ZAP-70 pozitivních nemocných (82). Expres ZAP-70 byla u CLL objevena na základě studia genového expresního profilu pomocí DNA mikročipů u skupiny IgVH mutovaných a nemutovaných pacientů v době, kdy bylo hledání zástupných faktorů pro mutační stav IgVH ve velkém popředí zájmu. Tato studie překvapivě zjistila, že genový profil obou těchto skupin pacientů je velice podobný a odpovídá paměťovým B-lymfocytům, přesto ale odhalila skupinu více než 100 odlišných genů, z nichž největší rozdíl v expresi měl právě gen pro ZAP-70. Většina pacientů s nemutovanými IgVH geny byla ZAP-70 pozitivní, pacienti s mutovanými geny byli převážně ZAP-70 negativní, a měli tedy lepší prognózu (81). Zdálo se, že ZAP-70 by se mohl stát zástupným faktorem mutačního IgVH stavu nejen pro vysoký stupeň konkordance, ale také pro méně náročný způsob stanovení flow cytometricky. Jako ZAP-70 pozitivní případy jsou považovány ty, kde je pozitivních více než 20 % buněk (82). Další studie však ukázaly, že ani v případě ZAP-70 není jeho korelace s mutačním IgVH stavem pravidlem a že až v 7-29 % případů existuje diskordance (22). Kröber et al. publikovali zajímavou studii velkého souboru pacientů (148 pacientů), kde rozdíl mezi expresí ZAP-70 a mutačním stavem závisel na přítomnosti dalších negativních prognostických ukazatelů jako del 17p, del 11q a VH3-21. Téměř u všech nemocných se ZAP-70 pozitivitou a mutovanými IgVH geny byla prokázána přítomnost genu VH3-21, která je samostatným negativním prognostickým ukazatelem nezávislým na mutačním stavu. Pacienti ZAP-70 negativní s nemutovanými IgVH geny měli ve většině případů zachyceny nepříznivé cytogenetické aberace (del 17p či del 11q) (88). Jiné studie tuto souvislost ale nepotvrdily (48). Jednu ze stěžejních prací týkajících se prognostické výpovědní hodnoty ZAP-70 publikoval Del Principe et al. na souboru 289 pacientů, v níž porovnával nález exprese ZAP-70, CD38 a mutačního stavu IgVH s klinickým průběhem onemocnění. Nemocné rozdělil do tří prognosticky odlišných skupin. Pacienti s negativitou ZAP-70 i CD38 a mutovanými IgVH geny tvořili skupinu s nejpříznivější prognózou se statisticky významně nejdelším obdobím do progresu i celkovým přežitím. Nejkratší PFS a OS měli naopak nemocní s pozitivitou ZAP-70 i CD38 a nemutovanými IgVH geny. Pacienti s diskordancí těchto znaků měli intermediární prognózu, kde důležitější roli než CD38 a mutační stav sehrávala exprese ZAP-70: pacienti ZAP-70 pozitivní, i pokud byli CD38 negativní s mutovanými IgVH geny, měli významně kratší PFS než nemocní ZAP-70 negativní s pozitivní expresí CD38 a nemutovanými IgVH geny (89). Zdálo se tedy, že exprese ZAP-70 má větší výpovědní hodnotu než mutační stav IgVH. Tento nález však musí být potvrzen v prospektivních studiích. Při interpretaci výsledků exprese ZAP-70 je také

nutné přihlédnout k některých specifických. Některé práce nově prokázaly, že i exprese ZAP-70 stejně jako exprese CD38 se může v průběhu onemocnění u části nemocných měnit (90). Zásadním problémem je nestandardizovaná metodika vyšetření průtokovou cytometrií (používání různých klonů protilátek či různých fluorochromů) a nutnost rychlého zpracování vzorku (3, 37). Dnes tedy víme, že expresi ZAP-70 nelze považovat za zástupný prognostický faktor mutačního stavu IgVH, ale je vhodné jej stejně tak jako expresi CD38 použít jako důležitý doplňující nepříznivý prognostický ukazatel k upřesnění individuálního rizika pacienta s CLL (40, 53).

3.2.3 Další nové prognostické faktory

I přes znalost nových prognostických faktorů se u CLL hledají další nové ukazatele, které by měly silnější prognostickou hodnotu, nebo by byly schopny lépe určit klinický průběh či například předpovědět rezistenci na léčbu. Studium některých z nich přineslo nový pohled na biologii CLL s některými léčebnými důsledky. Mezi tyto prognostické faktory u CLL můžeme zařadit expresi lipoproteinové lipázy (LPL) a poměr LPL/ADAM29, expresi dalších genů jako CLLU1, AID či LAG-3, expresi HLA-G molekuly, expresi CD49d, objev mikroRNA genů, ukazatele angiogeneze a délku telomer a telomerázovou aktivitu. Diskutovanou problematikou jsou také mutace TP53. Zcela recentně byly objeveny mutace dalších genů hrajících důležitou roli v patogenezi CLL, a to NOTCH1, BIRC3 a SF3B1. Většina těchto ukazatelů však vyžaduje potvrzení jejich prognostického významu v dalších studiích (3).

Lipoproteinová lipáza a poměr LPL/ADAM29

Lipoproteinová lipáza je enzym, který se za normálních okolností nachází v tukové tkáni, svalech, makrofázích a NK-buňkách, u nichž moduluje jejich cytotoxickou aktivitu. Normálně není zjištělná v T- a B-lymfocytech. Lipoproteinová lipáza sehrává důležitou úlohu v metabolismu lipidů, mutace LPL genu jsou spojeny s dyslipidemií a rozvojem aterosklerózy. Význam exprese LPL lymfocyty CLL zůstává nejasný, pravděpodobně sehrává úlohu v jejich aktivaci. Gen LPL u CLL byl objeven na základě studia expresního genového profilu u IgVH mutovaných a nemutovaných pacientů (stejně jako například gen pro ZAP-70) a byl zjištěn vysoký stupeň shody mezi expresí LPL a mutačním IgVH stavem (91, 92). U pacientů s nemutovanými IgVH geny je exprese LPL významně vyšší v porovnání s mutovanými IgVH geny, jak poprvé popsala práce německé CLL skupiny v roce 2005 (93).

Další studie poté potvrdily, že vysoká exprese LPL mRNA měřená kvantitativní RT-PCR v mononukleárních buňkách periferní krve koreluje s IgVH mutačním stavem až v 84 % případů a kromě mutačního stavu je také spojena s vysokou expresí ZAP-70, CD38, cytogenetickými aberacemi, krátkým LDT, pokročilejším klinickým stádiem, kratším obdobím do zahájení léčby, kratším celkovým přežitím, a tedy horší prognózou nemocných. Proč je však exprese LPL u IgVH nemutovaných CLL vysoká, není dosud známo. Zdá se, že v průběhu onemocnění zůstává stabilní (3, 37, 91, 92).

ADAM29 (a desintegrin and metalloproteinase domain 29) je dalším genem, jehož exprese se také liší mezi IgVH mutovanými a nemutovanými případy (1). Představuje gen kódující transmembránové proteiny sehrávající roli v četných buněčných interakcích. Na rozdíl od ostatních genů patřících do rodiny ADAM, které jsou exprimovány v rozličných tkáních, se ADAM29 za normálních okolností nachází pouze v buňkách testes. Stejně jako LPL i ADAM29 jsou na rozdíl od normálních B-lymfocytů vysoce exprimovány maligními B-lymfocyty u CLL, a to zejména u případů s mutovanými IgVH geny. Úloha ADAM29 v patogenezi CLL však zůstává také nejasná. Oppezo et al. jako první publikovali prognostický význam kombinované exprese - poměru LPL/ADAM29. Jde o další negativní prognostický faktor s vysokou korelací s mutačním IgVH stavem (92 %). Vysoká exprese LPL/ADAM29 měřená RT-PCR byla zjištěna u nemutovaných IgVH pacientů a spolu s pozitivitou ZAP-70 byla spojena s významně kratším obdobím bez události (event-free survival, EFS) v celé skupině nemocných a u pacientů v klinickém stádiu A dle Bineta. U pacientů ve stádiích Binet B a C se poměr LPL/ADAM29 stal nezávislým nepříznivým prognostickým faktorem určujícím přežití na rozdíl od exprese ZAP-70 (92). Korelaci exprese LPL i ADAM29 s mutačním IgVH stavem potvrdila i práce Malouma et al., ve které byla vysoká exprese LPL spolu u nemutovaných případů CLL spojena s významně kratším obdobím bez známek onemocnění i celkovým přežitím u nemocných v remisi po chemoterapii (fludarabin, cyklofosfamid) v porovnání s vysokou expresí ADAM29 a mutovanými IgVH geny (94).

Expresa dalších genů u chronické lymfocytární leukemie

Na základě studia expresního genového profilu byly u CLL identifikovány další geny, jejichž exprese je spojena s nepříznivým průběhem onemocnění. Takovým genem je např. CLLU1 (CLL upregulated gene1), první pro CLL specifický gen lokalizovaný na chromozomu 12q22, jehož funkce zatím zůstává nejasná (95). Několik prací prokázalo, že vysoká exprese CLLU1 je spojena s významně kratším obdobím do zahájení léčby a kratším celkovým přežitím (96). Tento nálezn byl v jedné práci statisticky významný pouze pro pacienty mladší 70 let, u

starších nemocných se rozdíl stíral. Zdá se, exprese CLLU1 je asociována se ZAP-70 a CD38 pozitivitou a nepříznivými cytogenetickými aberacemi. Mutační stav IgVH a exprese CLLU1 jsou pravděpodobně nezávislými prognostickými faktory (95, 96).

Jako nepříznivý prognostický marker se ukazuje vysoká exprese genu AID (activation-induced cytidine deaminase) nezbytného pro somatické hypermutace, která koreluje s nemutovanými IgVH geny, nepříznivými chromozomálními změnami, krátkým LDT, vysokým LDH a vysokou expresí CD38 (3, 4).

Dalším nepříznivým prognostickým ukazatelem u CLL se zdá být vysoká exprese genu LAG3 (lymphocyte-activation gene 3), která je spojena s nemutovanými IgVH geny a kratším obdobím do zahájení léčby (97).

Expresí molekuly HLA-G

Molekula HLA-G (human leukocyte antigen G) patří k neklasickým molekulám komplexu HLA I. třídy. Za normálních okolností má tkáňově omezenou distribuci a nachází se pouze na buňkách trofoblastu. Expresí HLA-G je spojena s významným imunosupresivním účinkem (inhibice migrace NK buněk, indukce apoptózy T-lymfocytů a další). Nádorové buňky s ektopickou HLA-G expresí tak mohou být chráněny před protinádorovým působením imunitního systému. Povrchová exprese HLA-G molekuly flow cytometricky byla vedle řady solidních nádorů, T a B-lymfomů prokázána i u CLL. Skupina pacientů s CLL s vysokou expresí (více než 23 % HLA-G pozitivních buněk) měla významně kratší období do progresu i období do zahájení léčby než pacienti s expresí nízkou. S vysokou HLA-G expresí byly také spojeny poruchy buněčné i humorální imunity (3, 98). Nová studie na velkém počtu pacientů s CLL však tato zjištění nepotvrdila, exprese HLA-G na buňkách CLL byla nízká a nijak nekorelovala s PFS (99). Role povrchové exprese HLA-G jako prognostického faktoru u CLL zůstává tedy nejasná, k objasnění jejího významu jsou třeba další studie.

Expresí CD49d

CD49d je molekula, kterou lze pomocí průtokové cytometrie zjistit na buňkách CLL. Tento integrin je zapojen do procesu migrace CLL buněk do lymfoidních tkání a usnadňuje interakce maligních lymfocytů se stromálními buňkami, což snižuje apoptický potenciál leukemických buněk. Zdá se, že vysoká exprese CD49d koreluje s kratším obdobím do zahájení léčby a kratším celkovým přežitím a že je nezávislým negativním prognostickým faktorem. Význam stanovení této molekuly spočívá kromě prognostického významu také

v tom, že v současné době je již v rámci klinických studií zkoušena monoklonální antiCD49d protilátka (Natalizumab) (100, 101).

Význam mikroRNA u chronické lymfocytární leukemie

MikroRNA (miRNA) jsou malé RNA molekuly, které působí jako post-transkripční regulátory genové exprese a mají důležité funkce v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze (102). V buňce vznikají transkripcí miR genů z DNA a následným sestřihem primárního transkriptu. Jeho dalším enzymatickým štěpením v cytoplazmě vzniká molekula mikroRNA, která se váže k cílové mRNA. Ta poté není translatována nebo je degradována, a tak dochází k regulaci množství proteinu kódovaného příslušnou mRNA (3, 102). U CLL byly zprvu popsány dvě miRNA, a to miR-15a a miR-16-1 nacházející se v oblasti 13q14, která bývá u pacientů s CLL často deletována. Ztráta či snížení exprese těchto miRNA vede ke zvýšení hladiny důležitého anti-apoptického proteinu Bcl-2, a tím ke snížení citlivosti CLL buněk vůči pro-apoptickým stimulům. V pokusech *in vitro* naopak správná funkce miR-15a a miR-16-1 vedla k významnému poklesu hladiny Bcl-2 a nastartování apoptózy nádorových buněk; tyto miRNA mají tedy funkci tumor supresorových molekul. Do budoucna se tak nabízí možnost léčebného využití těchto poznatků o miRNA u nádorů s vysokou expresí Bcl-2 (48, 73). Další studie poté u CLL odhalily skupinu dalších 13 miRNA, jejichž exprese souvisí s moderními prognostickými faktory (IgVH mutační stav, ZAP-70, cytogenetické aberace) a progresí onemocnění (3). Kromě miR-15a a miR16-1 jsou poměrně dobře prozkoumány miR-34a, miR-29c a miR-17-5p, jejichž snížená exprese byla popsána u pacientů s delecí 17p13 či mutací TP53, tedy u nemocných s nepříznivou prognózou. Například miR-34a je transkripčně aktivována p53; del 17p/mutace TP53 vede ke snížení její exprese, a tím ke zvýšení hladiny Bcl-2, která je miR-34a regulována. Funkci tumor supresorových molekul mají za normálních okolností i miR-29a, miR-29b a miR-181, které regulují Tcl-1 proto-onkogen. Vysoká exprese Tcl-1 je v pokusech spojena s rozvojem CLL, koreluje s agresivním průběhem CLL, pozitivitou ZAP-70 a nemutovanými IgVH geny (102). Studium mikroRNA by mohlo přinést další důležité informace o patogenezi a prognóze CLL.

Délka telomer a telomerázová aktivita u chronické lymfocytární leukemie

Telomery jsou koncové části chromozomů, které se zkracují při každém buněčném dělení. Ribonukleotidový komplex telomeráza je enzym pracující jako reverzní transkriptáza, který zajišťuje doplňování 3'-konců chromozomální DNA, je tedy schopen telomery prodlužovat. Za normálních okolností se telomeráza uplatňuje pouze v dělících se zárodečných buňkách či

nediferencovaných buňkách (například hematopoetické buňky kostní dřeně). V ostatních tělních buňkách je naopak její funkce blokována a každý cyklus replikace DNA je spojen se zkrácením chromozomů, které nakonec může vést až ke ztrátě schopnosti telomer maskovat konce chromozomů a odlišit je od neopravených zlomů. To má za následek aktivaci odpovědi na poškození DNA, která způsobí zastavení buněčného cyklu.

Vysoká aktivita telomerázy byla zjištěna i v nádorových buňkách, což umožňuje jejich mnohonásobné dělení (3, 103). Také u CLL bylo zjištěno, že zkrácení telomer a vysoká aktivita telomerázy jsou spojeny s horší prognózou a kratším celkovým přežitím. Zdá se, že tento nálezn také koreluje s nemutovanými IgVH geny, pozitivitou CD38 a ZAP-70. Vzhledem k vysoké aktivitě telomerázy u některých případů CLL s agresivním průběhem se do budoucna nabízí i možnost léčebného využití jejích inhibitorů (3, 48, 104).

Význam mutací TP53 u chronické lymfocytární leukemie

Jak již bylo řečeno, nejméně příznivým cytogenetickým nálezem u pacientů s CLL je delece 17p13 spojená se ztrátou funkce nádorového supresorového genu p53 (TP53), kódujícího protein p53 (33, 48). Častěji než samotná delece 17p13 vede k poškození funkce TP53 delece v kombinaci s mutací druhé alely (kompletní inaktivace genu). Bylo ale prokázáno, že stejnou výpovědní hodnotu jako samostatné delece či jejich kombinace s mutací mají i samostatné mutace TP53, které nejsou zachytitelné metodou FISH. Zdá se také, že samostatné mutace se u pacientů s CLL vyskytují významně častěji než samostatné delece (33). Nepříznivý vliv samotných mutací TP53 nezávisle na přítomnosti del 17p13 prokázala nedávná práce italských autorů. U velkého souboru pacientů potvrdili, že samostatná mutace TP53 má, stejně tak jako del 17p13 či kombinace del 17p13/mutace TP53, negativní vliv na celkové přežití a období do zahájení léčby a přináší s sebou rezistenci k fludarabinovým režimům. Nejčastěji se vyskytovaly mutace TP53 v exonu 5-8 (ve více než 95 %) z celkově vyšetřovaných exonů 2-10, v ostatních exonech byl výskyt mutací nízký (76). Ke stejnému závěru dospěla i analýza pacientů zařazených do studie CLL8. I zde bylo potvrzeno, že výskyt samostatných mutací TP53 nezávisle na přítomnosti del 17p13 je spojen s nižším procentem celkových léčebných odpovědí, kratším obdobím do progresu a kratším celkovým přežitím. U pacientů s mutací TP53 nebyl statisticky významný rozdíl v těchto parametrech ve skupinách léčených režimem FC v porovnání s FCR (105). I mnohé další práce prokázaly jednoznačný negativní význam samostatných mutací TP53 na období do zahájení léčby, celkové přežití i odpovědi na léčbu. Dále bylo prokázáno, že u léčených pacientů (chemoterapie i imunochemoterapie) s původně neporušenou dráhou p53 se objevují nové abnormality TP53, zejména nové mutace TP53.

Mutace TP53 se nacházejí v tzv. oblasti DNA vázajících domén, naprostá většina z nich jsou „missense mutace“ (mutace vedoucí k záměně aminokyseliny), menší část tvoří „frame shift mutace“ (mutace vedoucí k posunu čtecího rámce) (33, 106, 107).

I přes opakovaně prokázanou nezanedbatelnou prognostickou výpovědní hodnotu není v rutinní praxi standardně přítomnost mutací TP53 vyšetřována. Do budoucna je však toto vyšetření jistě na zvažení i vzhledem k možnosti volby léčebné strategie u pacientů s porušenou dráhou p53, kteří mohou vykazovat rezistenci k fludarabinovým režimům včetně režimů s imunoterapií (34, 105).

Mutace genů NOTCH1, BIRC3 a SF3B1 u chronické lymfocytární leukemie

Zcela nedávno byly objeveny mutace genů NOTCH1, BIRC3 a SF3B1, které sehrávají v patogenezi CLL významnou roli a které by mohly mít zásadní vliv na prognózu nemocných. NOTCH geny kódují transmembránové receptory - proteiny Notch 1,2 fungující jako transkripční faktory, které po navázání ligandu vedou ke spuštění nitrobuněčné signalizace a transkripci genů zahrnutých v procesech proliferace, diferenciaci a apoptózy (108). U CLL byla ověřena konstitutivní aktivace signální dráhy Notch vedoucí ke zvýšené aktivaci NF- κ B s následnou zvýšenou expresí anti-apoptických proteinů c-IAP a XIAP (109). Právě mutace NOTCH1 genů vedou ke konformačním změnám proteinu Notch1 spojených s akumulací jeho aktivní a stabilnější izofomy a ke stálé aktivaci signální cesty Notch (110). Práce Puente et al. a Fabbri et al. nově popsaly mutaci genu NOTCH1 u nemocných s CLL, která se vyskytovala v případech CLL s nepříznivou prognózou – u nemocných v pokročilých stádiích, nemutovanými IgVH geny, rapidně progredujícími (významně kratší období dogrese i období do zahájení léčby) a byla spojena s vysokým rizikem přechodu do Richterova syndromu a s významně kratším celkovým přežitím (v práci Fabbri et al. byla mutace NOTCH1 nezávislým negativním faktorem pro OS). Mutace NOTCH1 byla také zaznamenána u nemocných refrakterních na léčbu (108, 110). Tyto nálezy potvrdily i další práce na rozsáhlejších souborech nemocných s CLL, ve kterých byly mutace NOTCH1 dále spojeny s vysokou LDH, pozitivitou ZAP-70, CD38 a trisomií 12. Ve studii Rossi et al. byly rovněž nezávislým faktorem pro OS (111, 112). Dalším z nových objevů je mutace genu SF3B1, který je součástí jaderného spliceozomu řídicího odstraňování intronů z pre-mRNA. Je také spojena s nepříznivou prognózou – delecí 11q, nemutovanými IgVH geny, kratším obdobím do zahájení léčby i OS a vyšším výskytem u fludarabin-refrakterních případů CLL (113, 114). Mutace genu BIRC3, který za normálních okolností funguje jako tumor supresorový gen inhibující převážně aktivitu NF- κ B, vedou k inaktivaci jeho funkce a jsou

také spojeny s nepříznivými nálezy, zejména refrakterností na fludarabinové režimy. Významně vyšší frekvence mutací BIRC3, SF3B1 i NOTCH1 byla u fludarabin-refrakterních případů CLL zaznamenána u nemocných s neporušenou dráhou p53 (111, 114, 115). Tyto mutacemi by tedy mohly sloužit k časně identifikaci těch nemocných s neporušenou cestou p53, kteří mají přesto vysoké riziko necitlivosti na léčbu založené na purinových analogích, neboť přežití nemocných s těmito mutacemi je podobné skupině nemocných s poškozenou dráhou p53, kteří jsou také obvykle fludarabin-rezistentní (105, 108, 111, 114, 115).

Angiogeneze u chronické lymfocytární leukemie

Angiogeneze je novotvorba cév z již existující vaskulatury (116). Je přísně regulována angiogenními aktivátory a inhibitory, jejichž působení je za normálních okolností v rovnováze. Ke vzniku nové vaskulatury dochází při vychýlení rovnováhy buď zvýšením produkce angiogenních aktivátorů, či snížením produkce inhibitorů. Mezi nejsilnější aktivátory patří hypoxie, která vede expresí hypoxií indukovaných faktorů (hypoxia-inducible factors, HIF) ke zvýšené produkci proangiogenních cytokinů, které aktivují endotelové buňky a stimulují jejich proliferaci. Samy endotelie na podkladě těchto impulzů produkují proteolytické enzymy metaloproteinázy schopné rozrušovat mezibuněčnou hmotu. To dále usnadní proliferaci a migraci endotelií, které vytvoří lumen nové kapiláry (24, 117). Mezi důležité proangiogenní cytokiny patří cévní endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF), fibroblastový růstový faktor-2 (fibroblastic growth factor-2, FGF-2), transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta, TGF- β), interleukin-8, hepatocytární růstový faktor (hepatocyte growth factor, HGF), angiogenin, angiopoetiny a další. Důležitými inhibitory angiogeneze jsou endostatin, angiostatin, trombospondin 1, interferon alfa, destičkový růstový faktor 4 a další (12, 117). Angiogeneze hraje významnou roli u solidních nádorů, kde zásadně přispívá k jejich metastatickému rozsevu (116). Souvislost angiogeneze a nádorového bujení byla objevena Folkmanem již v roce 1971 (118). V 90. letech 20. století začal intenzivní výzkum angiogeneze i u hematologických malignit a bylo zjištěno, že i v případě CLL hraje angiogeneze důležitou úlohu v patogenezi onemocnění. Angiogenní procesy u CLL jsou výsledkem mnohostranných interakcí leukemických lymfocytů v mikroprostředí kostní dřeně s endotelovými buňkami, stromálními a podpůrnými („nurse-like“) buňkami, T-lymfocyty a NK-buňkami. Nedávno byla objevena schopnost leukemických CLL lymfocytů konstitutivně exprimovat HIF-1, což vede zejména ke zvýšení produkce VEGF (36). Důležitá studie Kaye et al. prokázala schopnost

leukemických lymfocytů produkovat širokou paletu pro- i antiangiogenních látek (119). V séru či plazmě pacientů s CLL byly nalezeny zvýšené koncentrace angiogenních faktorů, a to zejména VEGF a FGF-2 (9, 11, 28, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126). VEGF je glykoprotein působící jako ochranný faktor pro endotelové buňky – stimuluje jejich proliferaci a inhibuje apoptózu endotelií novotvořených cév, dále zvyšuje cévní propustnost (127). VEGF má ochrannou funkci i pro CLL buňky – zvyšuje jejich migraci a expresí anti-apoptických XIAP proteinů je chrání proti apoptóze (128). Důležitým nálezem je vedle produkce VEGF také exprese pro něj určených receptorů CLL buňkami, čímž je zajištěna i autokrinní stimulace novotvorby cév (12, 129). Gora-Tybor et al. také popsali že kromě membránové formy jsou v séru pacientů s CLL přítomny i solubilní receptory pro VEGF (130). Hlavní funkcí FGF-2 je úloha mitogenní a anti-apoptická (blíže viz. kapitola 4.4 Fibroblastový růstový faktor-2, jeho receptory a význam u chronické lymfocytární leukemie) (10, 131). VEGF i FGF-2 vedou také ke stimulaci produkce hematopoetických růstových faktorů endotelovými buňkami (kolonie stimulující faktor pro granulocyty a makrofágy; GM-CSF, interleukin-6 a další) a tyto cytokiny poté mohou autokrinně podpořit proliferaci a migraci endotelových buněk (132). Vyšší hladiny VEGF a FGF-2 jsou v některých pracech spojeny s pokročilým klinickým stádiem, časnou progresí CLL, nepříznivými prognostickými ukazateli (pozitivita CD38 a ZAP-70, nemutované IgVH geny, vyšší B2M, vyšší absolutní počet lymfocytů) a horší odpovědí na léčbu fludarabinem (9, 12, 28, 37, 123, 124, 130). Shanafelt et al. demonstrovali, že hladiny VEGF a poměr VEGF/trombospondin jsou důležitými prediktory léčebné odpovědi pro podání chemoimunoterapie (ve studii byla použita kombinace pentostatin, cyklofosfamid, rituximab): nižší koncentrace VEGF a nižší poměr VEGF/trombospondin měli před léčbou nemocní, kteří poté dosáhli kompletní či nodulární parciální remise v porovnání s nemocnými se stabilní chorobou či progresí. Nižší poměr VEGF/trombospondin také koreloval s celkovým přežitím (133). Některé práce prokázaly, že hladiny VEGF, FGF-2 i TGF- β klesají po intenzivní léčbě CLL založené na purinových analogích (121, 122).

Vedle VEGF a FGF-2 byly u CLL zaznamenány zvýšené plazmatické koncentrace solubilního endoglinu (sCD105). Endoglin je homodimerický transmembránový glykoprotein, tvořící součást receptorového komplexu pro TGF- β . sCD105 se účastní vývoje a remodelace cév tím, že ovlivňuje buněčné odpovědi na TGF- β prostřednictvím interakcí s TGF- β receptory. Tím je dána jeho nepostradatelná úloha v angiogenních pochodech (134, 135). Smolej et al. jako první publikovali souvislost mezi zvýšením plazmatických koncentrací endoglinu, pokročilými klinickými stádii a progresí CLL (134). Dalším z důležitých ukazatelů

angiogeneze je angiogenní cytokin angiopoetin-2 (136, 137). Působí jako růstový faktor pro endotelové buňky a u CLL je rovněž produkován i maligními B-lymfocyty. Zvýšená exprese mRNA pro angiopoetin-2 a jeho zvýšené plazmatické koncentrace jsou u CLL spojeny s nepříznivými prognostickými ukazateli, kratším obdobím do zahájení léčby 1. linie i kratším celkovým přežitím (136, 137, 138, 139). Důležitým angiogenním aktivátorem u CLL je také transformující růstový faktor beta (blíže viz. kapitola 3.3 Transformující růstový faktor beta, jeho receptory a význam u chronické lymfocytární leukemie) (140, 141).

Klasickým ukazatelem abnormální angiogeneze u CLL je kromě zvýšení sérových/plazmatických koncentrací angiogenních faktorů zvýšená mikrovaskulární denzita v kostní dřeni (počet kapilár na zorné pole či plochu histologického preparátu kostní dřene, MDV) (24). Zvýšená MVD byla prokázána i u pacientů s CLL v časných stádiích a je spojena s horší prognózou nemocných (významně kratší doba do progresu) (123). Některé studie však zvýšenou MDV ve dřeni u CLL nepotvrdily, či byla přítomna pouze u difúzní infiltrace dřene (24, 126). Příčinou nejednoznačných výsledků studií může být nedostatečný počet pacientů či rozdílné použité metodiky hodnocení. Je tedy třeba dalších, prospektivních studií k objasnění významu vaskularity dřene v patogenezi CLL (24). Výzkum angiogeneze u CLL je cenný nejen z prognostického, ale také z léčebného hlediska. Ve srovnání s klasickou léčbou cytostatiky vykazuje antiangiogenní léčba několik základních rozdílů – jde o léčbu cílenou na endotelové, nikoliv nádorové buňky a jejím hlavním cílem není tedy eliminace nádorového ložiska, ale zabránění jeho dalšího šíření odříznutím od přísunu kyslíku a živin. K dosažení tohoto efektu je nutné podávání antiangiogenních léčiv delší dobu než podávání chemoterapie, také nástup účinku je pozvolnější (117). V současné době jsou již k dispozici data o použití léčiv s antiangiogenním působením jako jsou thalidomid či jeho analog lenalidomid u některých hematologických malignit (zejména u mnohočetného myelomu) včetně CLL (117, 142). Zajímavé je, že také některá klasická cytostatika (například etoposid, cyklofosfamid a další) mají antiangiogenní účinek, zejména jsou-li podávána v nízkých dávkách a v pravidelných intervalech (117, 127).

3.3 Léčba CLL – přehled nejdůležitějších postupů a léčiv

Chronická lymfocytární leukemie je příkladem maligního onemocnění, u kterého se nebyvalé pokroky udály i v oblasti léčby. Ještě v 80. letech minulého století mělo neotřesitelnou pozici v léčbě 1. linie perorální alkylační cytostatikum chlorambucil. Jeho účinnost je však velice nízká, počet kompletních remisí zpravidla nedosahuje 10 %, dosaženo je zejména remisí parciálních a délka trvání léčebné odpovědi se pohybuje kolem 1 roku. Chlorambucil je v současné době vyhrazen pro použití u velmi komorbidních či starších nemocných, kteří nemohou být léčeni intenzivnějšími protokoly (18). Použití kombinovaných režimů chemoterapie (cyklofosfamid, doxorubicin, prednison – CAP, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison – CHOP) nepřineslo zlepšení léčebných výsledků (143). Pokrokem v léčbě CLL bylo až použití zástupce skupiny purinových analog, cytostatika fludarabinu. Mechanismus jeho působení spočívá v komplexním blokování syntézy DNA a v poruše reparačních mechanismů DNA následované apoptózou maligních lymfocytů (144). Fludarabin byl do léčby CLL zaveden počátkem 90. let 20. století, a to nejprve v monoterapii rezistentní choroby. V porovnání s chlorambucilem či s režimem CHOP bylo sice u fludarabinu dosaženo vyššího procenta celkových léčebných odpovědí a delšího období do progresu, nebylo ale prokázáno zlepšení celkového přežití (145). Vyšší účinnost stran zlepšení léčebných odpovědí (celkových i kompletních remisí) a období do progresu vykazuje kombinace fludarabinu s cyklofosfamidem (režim FC) v porovnání s monoterapií fludarabinem, jak prokázaly výsledky tří rozsáhlých randomizovaných studií (44, 146, 147). Režim FC byl proto až do zavedení chemoimunoterapie pokládán u CLL za léčbu 1. volby. Tak jako u ostatních CD20 pozitivních lymfoproliferací se i u CLL předpokládal účinek chimérické monoklonální protilátky anti-CD20 rituximabu. U CLL není monoterapie rituximabem efektivní pro nižší denzitu znaku CD20 na leukemických lymfocytech a rychlé odstranění rituximabu z oběhu solubilním CD20. Rituximab však zvyšuje účinnost cytostatické terapie, proto byly do léčby CLL zavedeny režimy kombinované chemoimunoterapie (18, 148). Nejúčinnějším schématem a v současné době standardem léčby 1. linie u CLL je režim FCR. Výsledky rozsáhlé multicentrické randomizované studie CLL8 německé skupiny pro CLL prokázaly přínos přidání rituximabu k FC v porovnání se samotným FC, a to nejen ve zvýšení celkových léčebných odpovědí (95,1 vs. 88,4 %), kompletních remisí (44,1 vs. 21,8 %) a období do progresu (51,8 vs. 32,8 měsíců), ale i v celkovém přežití (87,2 vs. 82,5 %; $p = 0,012$), což je zcela přelomová situace v dějinách léčby CLL (34). Obdobných výsledků v léčbě relapsu dosáhla mezinárodní studie REACH,

kteřá také potvrdila vyšší účinnost chemoimunoterapie FCR vůči FC (avšak bez prodloužení celkového přežití) (149). Velmi slibné výsledky přinesl nízkodávkovaný protokol FCR se zachovalou standardní dávkou rituximabu (s redukcí dávek FC) určený pro léčbu starších či komorbidních nemocných s CLL, kteří jsou ale stále schopni podstoupit intenzivnější léčbu (150). „Konkurentem“ režimu FCR by se mohla stát kombinace bendamustinu (molekula s kombinovanými vlastnostmi alkylační látky a purinového analogu) s rituximabem (režim BR), která na základě proběhlých studií vykazuje vynikající výsledky u dosud neléčených nemocných (ORR/CR v 91/33 %) i u nemocných s relapsem CLL (ORR/CR 71/15 %) (151, 152). Tyto nadějně výsledky jsou nyní ověřovány v randomizované studii CLL10 (FCR vs. BR v 1. linii). Další z monoklonálních protilátek, která vedle rituximabu našla uplatnění v léčbě CLL, je alemtuzumab, humanizovaná potkaní protilátka anti-CD52. V léčbě refrakterní a rezistentní choroby u těžce předléčených pacientů dosáhl alemtuzumab v registrační studii 33 % ORR a 2 % CR (153). Proběhla i randomizovaná studie, v níž byl alemtuzumab použit v léčbě 1. linie ve srovnání s chlorambucilem. Bylo dosaženo 83 % ORR a 24 % CR, medián PFS byl 23 měsíců, což představovalo významně lepší účinnost vůči kontrolní skupině léčené chlorambucilem (ORR/CR 55/2 %, medián PFS 15 měsíců) (79). Široké využití v léčbě 1. linie však alemtuzumab nenalezl. Důvodem je vedle volby chlorambucilu do kontrolního ramene zejména absence dat pro přímé srovnání s FCR. Při terapii alemtuzumabem dochází ke zvýšení rizika výskytu některých oportunních infekcí, a to zejména mykotických včetně infekcí *Pneumocystis jirovecii* či k reaktivacím cytomegaloviru (CMV). Obligátní součástí léčby je proto antimikrobiální profylaxe (sulfamethoxazol/trimetoprim, aciklovir nebo analogu) po dobu léčby a minimálně 2 měsíce po jejím skončení a nutnost monitorace CMV nejčastěji kvantitativní PCR. V současné době je alemtuzumab schválen pro léčbu relabující a refrakterní CLL u nemocných v minulosti léčených alkylačními látkami, u nichž došlo k selhání chemoterapie obsahující fludarabin. Dalšími možnými indikacemi k léčbě alemtuzumabem jsou dle recentních doporučení České společnosti pro CLL podání jako léčba 1. linie u nemocných, kteří nemohou být léčeni fludarabinovými režimy, podání u nemocných s del 17p13 a léčba nemocných s refrakterní autoimunní cytopenií (18, 154). Autologní transplantace kostní dřeně či periferních kmenových buněk vykazuje obdobné výsledky jako při použití protokolů chemoimunoterapie, proto se jako léčebná metoda u CLL prakticky nevyužívá (155). Jedinou možností s kurabilním potenciálem je v současné době u CLL alogenní transplantace (od příbuzného či nepříbuzného dárce) kostní dřeně či častěji periferních kmenových buněk (21). U CLL je preferován tzv. nemyeloablativní přípravný režim, jehož použití je zatíženo daleko nižší peritransplantační mortalitou než použití

myeloablativního režimu a lze jej uplatnit u nemocných až do 70 let věku. Hlavním léčebným efektem u alogenní transplantace je kromě výrazného imunosupresivního vlivu přípravného režimu také reakce štěpu proti leukemii (graft versus leukemia effect, GvL), díky níž dochází k eliminaci zbytkového leukemického klonu v kostní dřeni (18, 21, 155). Dosud neexistují randomizované studie hodnotící transplantační přístup u CLL. Dle současného doporučení by alogenní transplantace měla být včas provedena každému nemocnému s CLL s nepříznivým klinickým průběhem, zejména při refrakternosti na fludarabinové režimy (155). Alogenní transplantace sice přináší naději na úplné vyléčení CLL, reálně je však proveditelná pouze u malé části nemocných, neboť je i přes použití nemyeloablativních režimů zatížena nezanedbatelnou mortalitou. Z tohoto důvodu a s přihlédnutím k faktu, že všichni netransplantovaní nemocní i přes použití intenzivní léčby relabují a onemocnění se postupně stává refrakterní, jsou hledány další léčebné postupy, které by měly plně kurabilní potenciál. V rámci klinických studií byly zkoušeny další kombinace chemoimunoterapie, například přidání alemtuzumabu k FCR, FC či samotnému fludarabinu. I přes poměrně vysoká procenta ORR a CR však tyto režimy vedly vedle výrazné hematologické toxicity také k častějšímu výskytu těžkých infekcí, svoje uplatnění v klinické praxi tedy zatím nenalezly (shrnutí v (20)). Naopak velmi nadějně se jeví kombinace režimu FCM (FC + mitoxantron) s rituximabem (režim RFCM), kterou je dosahováno velmi vysokého procenta ORR i CR (ORR/CR 93/82 %) s poměrně dobře přijatelnou toxicitou (156). U nemocných refrakterních na fludarabin i alemtuzumab či u nemocných s masivní lymfadenopatií, u nichž je většinou účinnost alemtuzumabu nízká a kteří nejsou vhodnými kandidáty alogenní transplantace, se nabízí možnost kombinace vysokých dávek kortikoidů (nejčastěji methylprednisolonu či dexamethasonu) a rituximabu. U těchto režimů je sice zaznamenáno dosti vysoké procento ORR, problémem je však poměrně krátké období do progresu a nezanedbatelný výskyt infekčních komplikací (157, 158, 159). Pro tuto skupinu nemocných se nadějným stává podání plně lidské anti-CD20 monoklonální protilátky ofatumumabu. Jde o protilátku, která se váže na jiný epitop antigenu CD20 než rituximab a vykazuje *in vitro* vyšší efektivitu než rituximab (160). Při terapii ofatumumabem bylo dosaženo 51 % ORR u nemocných refrakterních jak na fludarabin, tak na alemtuzumab a 44 % ORR u nemocných refrakterních na fludarabin s masivní lymfadenopatií (a tedy nevhodných k léčbě alemtuzumabem) (161). Kombinace ofatumumabu s FC u neléčených nemocných sice vykazuje účinnost, ale nedosahuje srovnatelných výsledků jako FCR (162).

V rámci klinických studií se v současnosti zkouší řada dalších preparátů. Ze skupiny monoklonálních protilátek je kromě ofatumumabu třeba jmenovat lumiliximab, chimérickou

anti-CD23 protilátku použitou v kombinaci s FCR u relapsu CLL ve studii fázi II. Tato kombinace dosáhla zvýšení CR (48 % vs. 25 %) ve srovnání s historickými kontrolami léčenými FCR, bez vyšší toxicity (163). Nadějnými se zdá být i použití léčiv s imunomodulačním a antiangiogenním účinkem, jako jsou thalidomid či novější preparát lenalidomid. Obě tato léčiva patří do skupiny tzv. ImiDs (Immunomodulating drugs), léčiv kombinujících zejména účinky imunomodulační a antiangiogenní. Ovlivňují buněčné interakce maligních buněk s ostatními elementy v mikroprostředí uzlin či dřeně (117, 142). Konkrétně jde například o blokádu VEGF, FGF-2, IL-1, IL-6, TNF- α , adhezivních molekul a dalších cytokinů (117, 127). Thalidomid byl použit v monoterapii i v kombinaci s fludarabinem u předléčených a refrakterních/relabujících CLL i u neléčených případů (164). Zejména u neléčených nemocných vedla tato kombinace ve dvou malých studiích k velmi dobrým výsledkům (ORR 100 %, CR 55 %, resp. ORR 80 %, CR 25 %) s přijatelnou toxicitou (165, 166). Limitací použití thalidomidu ve většině ostatních studií byly zejména nežádoucí účinky neurologické a rozvoj tzv. „tumor flare syndromu“ projevujícího se bolestivým zduřením uzlin, horečkou a „flu-like“ příznaky (164). Lenalidomid je derivátem thalidomidu, oproti němu se vyznačuje velmi nízkou neurotoxicitou, ale vyšší toxicitou hematologickou. Po jeho podání byly u CLL popsány i případy syndromu nádorového rozpadu. Je výrazně silnějším inhibítorem TNF- α se slabším antiangiogenním účinkem než thalidomid (128, 164). V současné době jde o jedno z nejvíce zkoušených léčiv u CLL, a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s cytostatiky či rituximabem. Poprvé byl u refrakterních/relabujících případů CLL použit v monoterapii ve studii Chanan-Khana s velmi slibnými výsledky (ORR 47 %, CR 9 %, PR 38 %) (167). Méně uspokojivé závěry přinesla studie Ferrajoliho et al. u refrakterních/relabujících CLL (ORR 32 %, CR 7 %) (168). Účinek lenalidomidu se ověřuje i u neléčených nemocných s CLL včetně těch s nepříznivou prognózou jak v monoterapii, tak i v kombinaci. Výsledky jednotlivých studií se liší, je třeba rozsáhlejších randomizovaných studií. Z nových léčiv u CLL jde o jedno z neúčinnějších, limitující však může být zejména pro výrazně předléčené nemocné s CLL jeho hematologická toxicita a dále i riziko rozvoje syndromu nádorového rozpadu zejména u nemocných s velkou nádorovou masou (128, 164). Formou kazuistického sdělení byl popsán případ nemocného s refrakterní CLL, u něhož dlouhodobé podávání lenalidomidu (po 4 roky) vedlo k dosažení a udržení molekulární remise onemocnění (169).

Další skupinou léčiv jsou inhibitory cyklin-dependentních kináz, k dispozici jsou data o použití flavopiridolu (alvocidib), který účinkuje nezávisle na signální dráze proteinu p53, a stává se tak potenciálně vhodným lékem pro refrakterní nemocné s delecí 17p13. Antisense

oligonukleotid proti Bcl-2 oblimersen byl použit v kombinaci s FC u nemocných s relabovanou/refrakterní CLL. Ve studiích se také ověřuje efekt inhibitoru proteasomu bortezomidu (31, 77, 170).

3.4 CLL – shrnutí

V několika posledních letech doznaly diagnostika i léčba u CLL nebývalý pokrok. Také objev některých nových prognostických faktorů umožnil přesnější zhodnocení prognózy a rizika progresu nemocných s CLL již v době stanovení diagnózy. Otázkou do budoucna zůstává problém, jak co nejlépe načasovat a přizpůsobit intenzitu léčby individuálnímu riziku nemocného právě na základě znalosti těchto moderních prognostických faktorů. Z tohoto hlediska má zatím dominantní postavení nepříznivá cytogenetická aberace delece 17p13, jejíž přítomnost může v některých případech ovlivnit výběr cíleného léčebného postupu (33, 37, 48, 171). Nález ostatních nepříznivých ukazatelů, ať už dalších cytogenetických změn, nemutovaných IgVH genů či vysoká exprese CD38 a ZAP-70 tvoří důležité doplňující informace o prognóze nemocných. Je nutno zdůraznit, že žádný z těchto ani dalších nových prognostických faktorů sám o sobě není důvodem k zahájení léčby. Pro zahájení léčby u pacientů s CLL je nadále dle aktuálních kritérií NCI-WG z roku 2008 rozhodující aktivita choroby (15). To, zda a kdy by měla být léčba zahájena na základě určení negativních prognostických faktorů zejména u pacientů v časných klinických stádiích a zda by nemocní z včasného zahájení léčby profitovali, je otázkou, kterou se zabývají klinické prospektivní studie a na kterou v současné době dosud nemáme jednoznačnou odpověď (1, 4). Pokrokem v léčbě CLL je odklon od paliativních postupů směrem k vysoce účinné chemoterapii a chemoimunoterapii s výrazným zvýšením léčebné odpovědi, doby do progresu i celkového přežití. U některých nemocných mají tato schémata léčby kromě dosažení kompletní hematologické remise i potenciál dosáhnout remise molekulární (30, 34, 149, 172). Nezanedbatelným přínosem jsou také probíhající klinické studie ověřující účinnost celé řady nových preparátů s rozličnými mechanismy působení (171).

4. Vybrané ukazatele angiogeneze a apoptózy u CLL – teoretický úvod

4.1 Signální dráha nukleárního faktoru kappa B a její význam u chronické lymfocytární leukemie

Významnou roli v patogenezi CLL sehrává signální dráha NF- κ B. Nukleární faktor kappa B je důležitý cytoplazmatický transkripční faktor, který patří do rodiny Rel/NF- κ B transkripčních faktorů zahrnující dvě skupiny proteinů. V první z nich jsou proteiny označované jako c-Rel, RelA(p65) a RelB, do druhé skupiny jsou řazeny proteiny NF- κ B1(p50) a NF- κ B2(p52) (25). V klidovém stavu je NF- κ B v cytoplazmě vázán na inhibitory (I κ B proteiny) a je neaktivní. K aktivaci NF- κ B mohou vést dvě cesty - klasická a alternativní (173, 174). Klasickou cestou se aktivují převážně proteiny NF- κ B1/RelA a RelA/c-Rel a dochází k ní po navázání antigenů na buněčné receptory pro T či B-lymfocyty (TCR, BCR), receptory pro interleukin-1 (IL-1-R) nebo receptory pro tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α -R1). Tato vazba nastartuje komplexní kaskádu reakcí aktivující beta podjednotku specifického I κ B-kinázového komplexu (IKK) vedoucí k fosforylaci a následné degradaci inhibitoru I κ B pomocí proteazomů. Tím dochází k uvolnění NF- κ B z vazby na inhibitor. Volný NF- κ B se poté translokuje do buněčného jádra, kde po navázání na příslušné genomové sekvence pozitivně reguluje transkripci řady genů. Alternativní cesta aktivace je odlišná - uplatňují se nitrobuněčné signály vznikající po vazbě na receptory pro lymfotoxin- β (LT-R) a BAFF receptory (B-cell activating factor receptor, BAFF-R), které vedou na IKK závislé fosforylaci NF- κ B2p100 a vzniku aktivního proteinu NF- κ B2p52, který je opět zodpovědný za transkripci příslušných genů (25, 173). Geny, které jsou NF- κ B pozitivně transkripčně regulovány, se uplatňují v procesech růstu, proliferace, diferenciace a také apoptózy mnohých typů buněk. Jsou mezi nimi například geny pro interleukiny (IL-2, IL-4, IL-13 a IL-18), receptor pro IL-2, C-lektin (CD69 – časný aktivační marker), adhezní molekuly (Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1; CD54), růstové faktory (granulocytární kolonie stimulující faktor, G-CSF; kolonie stimulující faktor pro makrofágy, M-CSF), TNF- α , interferon gamma (IFN- γ), anti-apoptické proteiny (IAP, TRAF a XIAP), CD40 ligand (CD40L), molekuly hrající roli v průběhu imunitní odpovědi a zánětu (například TCR, C3 a 4 složky komplementu, COX-2) a řada dalších (32, 175). Ke zvýšené expresi a aktivaci NF- κ B může vést mnoho nejrůznějších stimulů, například působení virů, bakterií, ultrafialového záření, mitogenů, růstových faktorů a v neposlední řadě i mnoho cytokinů včetně TNF- α . S aktivací signální dráhy NF- κ B se můžeme setkat u celé řady fyziologických

dějů. Značnou měrou je odpovědný za aktivaci T i B-lymfocytů po kontaktu s antigenem a za jejich následnou klonální expanzi v rámci specifické imunitní odpovědi. K aktivaci NF- κ B zde dochází po navázání antigenu na TCR či BCR. Nukleární faktor kappa B sehrává také důležitou úlohu v B-lymfopoeze. V B-lymfocytech postrádajících Rel/NF- κ B proteiny byly zaznamenány poruchy aktivace, vyžívání a zkrácené přežívání, které úzce souviselo s vysokým procentem apoptózy těchto buněk. Důvodem je pravděpodobně abnormálně nízká exprese jednoho z hlavních anti-apoptických proteinů Bcl-2 u Rel/NF- κ B defektních B-lymfocytů. Naopak exprese NF- κ B proteinů ve zralých periferních B-lymfocytech zvyšuje jejich přežívání, za což je velkou měrou odpovědný BAFF protein (B-cell activating factor), člen rodiny TNF- α proteinů. Protein BAFF je vylučován zejména antigen-prezentujícími buňkami a je nezbytný pro diferenciaci B-lymfocytů a produkci protilátek. Po navázání na příslušný receptor (existují 3 typy, nejdůležitější roli hraje tzv. BAFF-R neboli BR3) vede ke spuštění nitrobuňčné signalizace v rámci alternativní cesty aktivace NF- κ B vedoucí k expresi Bcl-2 a Bcl-X_L, a tím brání nastartování apoptózy během zrání B-lymfocytů. Defekt BAFF-R či BAFF proteinu vede k dramatickému snížení poolu zralých periferních B-lymfocytů v důsledku jejich apoptózy. Zvýšená exprese BAFF i BAFF-R byla zaznamenána u většiny nehodgkinových lymfomů, mnohočetného myelomu i u CLL, což přispívá k prodloužení životaschopnosti maligních buněk (25, 176). Důležitou roli sehrává NF- κ B i při aktivaci buněk monocyto-makrofágové linie po kontaktu s molekulárními znaky asociovanými s patogenem (PAMPs), zejména s lipopolysacharidem (174). Stálá aktivace signální dráhy NF- κ B byla zaznamenána i u CLL, a právě tento mechanismus je jedním z hlavních, který u CLL vede ke zvýšení metabolismu buněk, jejich proliferaci a v neposlední řadě také umocňuje nevnímavost leukemických buněk vůči apoptóze, a tím zvyšuje jejich přežívání (25, 177, 178, 179). Stupeň aktivace NF- κ B u CLL je závislý na klinickém stádiu a léčbě (173). Jako ukazatel míry aktivace dráhy NF- κ B jsme zvolili sérovou hladinu TNF- α .

4.1.1 Význam exprese některých molekul a cytokinů hrajících roli v patogenezi CLL (mimo TNF- α) regulované signální dráhou NF- κ B

Ligand pro CD40

Jednou z nejlépe prozkoumaných interakcí majících úlohu v patogenezi CLL je problematika ligandu pro CD40 (CD40L, CD154). CD40L, člen rodiny proteinů TNF- α , je 39 kDa membránový glykoprotein exprimovaný zejména aktivovanými T-lymfocyty. CD40L existuje také v solubilní 15-20 kDa formě a u CLL je vylučován i maligními B-lymfocyty. V plazmě

nemocných s CLL byly prokázány vysoké hladiny CD40L a buňky CLL exprimují pro CD40L transmembránový receptor CD40 (24, 29). Interakce CD40L/CD40 u pacientů s CLL vede ke zvýšené proliferaci a inhibici apoptózy maligních buněk, čímž přispívá k jejich akumulaci (mimo jiné i díky silné aktivaci dráhy NF- κ B). Maligní buňky dále inhibují expresi CD40L normálními T-lymfocyty, a tím zhoršují jejich interakce s B-lymfocyty a antigenprezentujícími buňkami, a přispívají tak k imunosupresi u CLL. Další z imunitních poruch způsobených expresí CD40L maligními buňkami je jimi indukovaná produkce autoreaktivních protilátek B-lymfocyty vedoucí k rozvoji autoimunitních fenoménů u CLL. Interakce CD40L/CD40 vede u CLL také k inhibici fludarabinem indukované apoptózy *in vitro* (24, 29, 180). V rámci klinických studií již byla využita monoklonální protilátka proti CD40L (181, 182).

Interleukin-2, interleukin-4

Interleukin-2 je glykoprotein produkovaný převážně CD4⁺ T-lymfocyty. Je nezbytný pro proliferaci a diferenciaci T-lymfocytů a LAK buněk (lymphokine-activated killer cells) schopných zahubit různé typy nádorových elementů. IL-2 může stimulovat produkci dalších cytokinů, jako jsou TNF- α , IFN- γ či GM-CSF. IL-2 byl prvním zkoumaným cytokinem u CLL s předpokládanou úlohou v patogenezi, maligní lymfocyty jej však s největší pravděpodobností samy nevyučují (29). Buňky CLL nesou ale pro IL-2 receptor (IL-2-R, resp. jeho lehké řetězce α , CD25), jehož exprese je stimulována právě působením IL-2. V solubilní formě byl IL-2-R u CLL nalezen také v séru. IL-2 u CLL zvyšuje proliferaci maligních B-lymfocytů, působí anti-apopticky stimulací produkce anti-apoptických proteinů (např. Mcl-1, Bcl-X_L) a přispívá k progresi onemocnění (183, 184). Vede také ke zvýšení exprese receptorů pro hematopoetické růstové faktory na maligních buňkách, a tím potencuje jejich proliferaci (185). Předpokládá se, že v důsledku vazby IL-2 na povrchový i solubilní receptor IL-2-R, dochází u CLL k jeho relativní nedostupnosti pro T-lymfocyty a LAK, což přispívá k imunitním poruchám (29).

Interleukin-4 je cytokin produkovaný zejména T-lymfocyty (v případě CLL zejména TH2 CD30⁺ T-lymfocyty) a je důležitý pro proliferaci normálních B-lymfocytů. Buňky CLL nesou receptor pro IL-4 (IL-4-R), jeho exprese je konstitutivní a vyšší než na normálních B-buňkách (186). Leukemické lymfocyty CLL samy IL-4 nevyučují, ale prostřednictvím vlastní produkce interleukinu-6 vedou k přesmyku TH1 subsetu lymfocytů na TH2, který IL-4 ve velkém množství secernuje (187). U CLL umocňuje IL-4 na CD40 závislou proliferaci maligních buněk (naopak brzdí IL-2 či TNF- α stimulovanou proliferaci) a působí anti-

apopticky (zvýšenou produkcí anti-apoptických proteinů Mcl-1, Bcl-X_L i Bcl-2) (29, 186, 187). Nově bylo potvrzeno, že IL-4 u CLL indukuje rezistenci na fludarabin a chlorambucil a že tento efekt může být zrušen použitím specifického JAK 3 inhibitoru PF-956980 (nitrobuněčná signalizace po vazbě IL-4 na IL-4-R totiž zahrnuje aktivaci JAK 1 a 3 ([Janus protein tyrosine kinase]) (187).

Interferon gamma

Interferon gamma (IFN- γ) je cytokin, který je produkován velmi omezeným počtem buněk – jedná se především o subset TH1 pomocných T-lymfocytů po jejich antigenní stimulaci, monocyty, makrofágy a NK-buňky. IFN- γ kromě svého imunomodulačního účinku hraje důležitou roli v obraně proti intracelulárním mikrobům. Kromě T-lymfocytů jsou u CLL zdrojem INF- γ i maligní B-lymfocyty, které také exprimují pro něj určené receptory, čímž je zajištěno jeho autokrinní působení. Zvýšené hladiny INF- γ lze v séru pacientů prokázat. INF- γ u CLL stimuluje buněčnou proliferaci a brzdí apoptózu a je spojen s pokročilým stádiem a progresí choroby (188, 189, 190).

V případě CD40L, IL-2, IL-4 i IFN- γ je patrné, že i T-lymfocyty, které tyto cytokiny vylučují a které jsou v prostředí lymfatických uzlin, kostní dřeně a sleziny v těsném kontaktu s maligními buňkami (zejména v tzv. proliferačních centrech - pseudofolikulech), hrají v patogenezi CLL důležitou roli. Kromě T-lymfocytů přispívají k prodloužení přežití leukemických buněk v mikroprostředí kostní dřeně a lymfatických uzlin také stromální, podpůrné buňky („nurse-like“) a endotelové buňky (24, 187).

Anti-apoptické proteiny

U CLL byla zaznamenána NF- κ B indukovaná exprese anti-apoptických proteinů IAP a TRAF 1,2. Hlavním a dobře prozkoumaným mechanismem účinku IAP, stěžejních inhibitorů apoptózy vůbec, je přímá inhibice některých kaspáz (váží se přímo na kaspázy 3, 7 a 9), enzymů nezbytných pro průběh apoptických dějů (26, 35). Z rodiny IAP jsou u CLL zvýšeně exprimovány c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP a survivin. Poslední dva jmenované jsou navíc zvýšeně exprimovány u nemocných s progresivní CLL. Koexprese c-IAP-1 a survivinu je u CLL spojena s horší odpovědí na léčbu a kratším celkovým přežitím. K dispozici jsou dnes data o použití antagonistů IAP (191, 192).

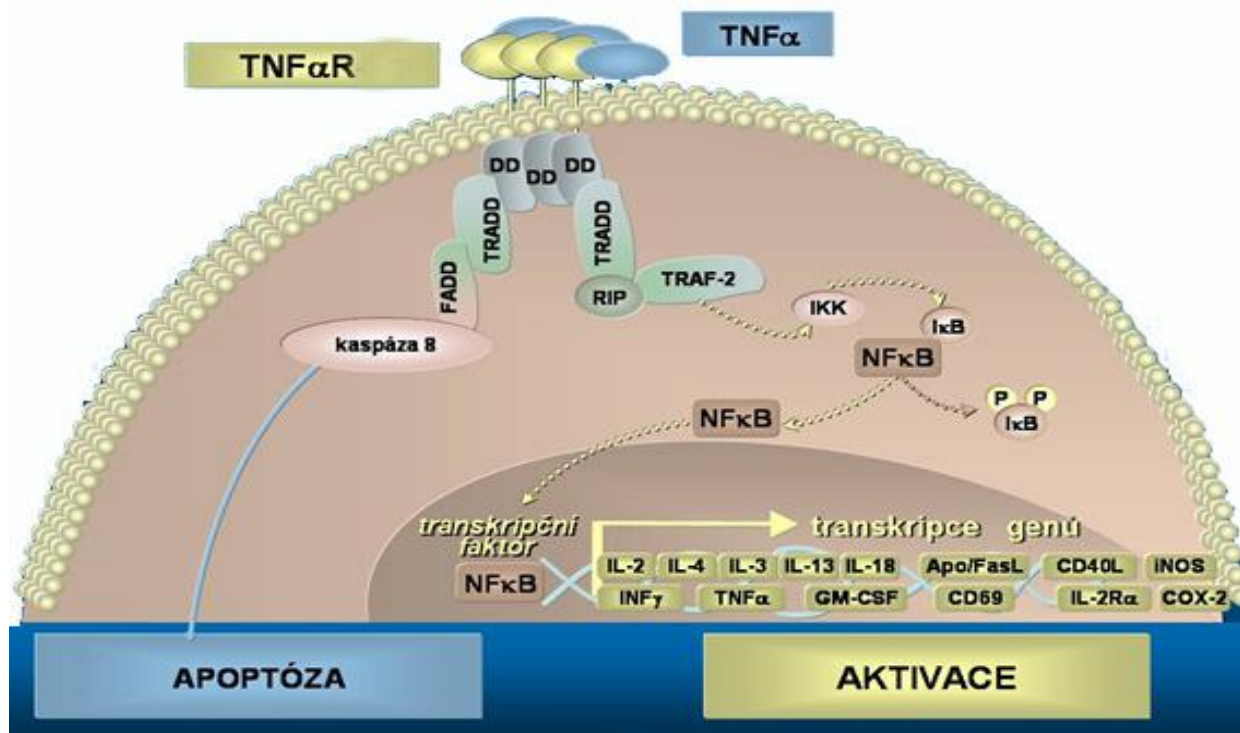
4.2 Tumor nekrotizující faktor alfa a jeho význam u chronické lymfocytární leukemie

4.2.1 Tumor nekrotizující faktor alfa obecně

Tumor nekrotizující faktor alfa je cytokin, který je produkován zejména monocyty a makrofágy, po stimulaci jej produkují i T a B-lymfocyty, NK-buňky, neutrofilů, keratinocyty a endotelové buňky. Geny kódující syntézu TNF- α leží na krátkém rameni 6. chromozomu (6, 193). Existuje ve formě solubilní (s molekulovou hmotností 17 kDa, sestávající ze 157 aminokyselin) a transmembránově vázané (s molekulovou hmotností 26 kDa, polypeptid sestávající z 233 aminokyselin), jejíž proteolýzou pomocí metaloproteinázy TACE (TNF- α -converting enzyme) vzniká právě frakce solubilní. Transmembránový TNF- α má vedle funkce ligandu vázajícího se na TNF receptory cílových buněk i funkci receptorovou (na rozdíl od solubilního TNF- α), která se uplatňuje v přenosu signálů zejména při zánětlivých procesech (viz. dále). Působení obou forem TNF- α se uplatňuje až po navázání na specifické receptory. Existují dva typy receptorů, které jsou exprimovány na většině jaderných buněk - TNF- α -R1 (CD120a, 55 kDa) a TNF- α -R2 (CD120b, 75 kDa) (194, 195). Receptory pro TNF- α se snadno uvolňují z povrchu buněk, v solubilní podobě se váží na TNF- α a neutralizují jeho imunobiologické působení (193). Biologický efekt TNF- α je různorodý: vazbou převážně na TNF- α -R1 působí jako induktor apoptózy, naopak vazbou převážně na TNF- α -R2, která je určena zejména pro interakce s transmembránovým TNF- α , působí anti-apopticky a vede ke stimulaci přežívání buněk aktivací NF- κ B (Obr. 3). Nezanedbatelný je jeho prozánětlivý potenciál, který se uplatňuje při akutních zánětlivých pochodech (stimulace produkce bílkovin akutní fáze, indukce exprese adhezních molekul na endotelových buňkách, indukce produkce syntézy prozánětlivých cytokinů a chemokinů jako IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, zvýšení tělesné teploty v důsledku ovlivnění neuroendokrinní regulace v hypotalamu a další) i v patogenezi chronických zánětlivých onemocnění typu psoriázy, revmatoidní artritidy, systémového lupus erytematoses či Crohnovy choroby a dalších. Zdá se, že stěžejní úlohu zde má transmembránový TNF- α (193, 194, 196). Další důležitou roli sehraává TNF- α v průběhu infekčních onemocnění, kde působí cytotoxicky - u HIV (human immunodeficiency virus) infekce způsobuje smrt HIV-infikovaných CD4⁺ T-lymfocytů; dále také brání růstu řady intracelulárních patogenů v makrofázích. V boji proti infekci se uplatňuje i jeho efekt na B-lymfocyty, u kterých stimuluje proliferaci a produkci IgG protilátek; u NK-buněk zvyšuje jejich cytotoxickou aktivitu (194).

Obrázek 3. Pro-apoptické a anti-apoptické působení TNF- α

TNF- α může mít na buňku zcela protichůdné účinky – jeho působením může dojít k vyvolání apoptózy, či naopak ke stimulaci přežívání buněk aktivací NF- κ B. U CLL se funkce TNF- α uplatňuje aktivací signální dráhy NF- κ B. Převzato a pravěno dle Krejsek, J., et al, *Klinická imunologie*. 2004 (32).



4.2.2 Tumor nekrotizující faktor alfa u CLL

Mnoho prací potvrdilo, že B-lymfocyty u CLL konstitutivně a spontánně produkují TNF- α a jeho zvýšené sérové/plazmatické koncentrace byly u nemocných s CLL opakovaně prokázány (6, 126, 185, 196, 197, 198, 199, 200). U pacientů s CLL byla zjištěna exprese obou typů receptorů na maligních B-lymfocytech, receptory byly nalezeny v solubilní formě také v séru (198, 201). TNF- α tedy u CLL působí i autokrinně (6, 29, 201). Funkce TNF- α je u CLL zprostředkována aktivací signální dráhy NF- κ B. Po vazbě TNF- α na příslušný receptor na povrchu maligního B-lymfocytu se v cytoplazmě aktivují proteiny TRAF, které indukují fosforylaci inhibitoru I κ B následovanou aktivací NF- κ B vedoucí k transkripci cílových genů (viz. výše). Proteiny TRAF tvoří tedy nitrobuněčný signalizační most mezi TNF- α -R a konečnou aktivací NF- κ B (Obr. 3). Zvýšené hladiny TRAF 1 proteinu (v menší míře i TRAF 2 proteinu) byly ve srovnání s normálními lymfocyty zaznamenány u více než poloviny neléčených pacientů s CLL a u více než 80 % pacientů refrakterních na léčbu (29, 35). I když

je biologický efekt TNF- α různorodý, většina prací prokázala, že u CLL převažuje jeho funkce anti-apoptická a že působí jako autokrinní růstový faktor pro maligní B-lymfocyty (6, 29, 201, 202). Anti-apoptická funkce je zajištěna zvýšenou expresí inhibitorů apoptózy (proteinů c-IAP, TRAF 1,2). K proliferačnímu potenciálu TNF- α přispívá i působení cytokinů, zejména IL-2. Interleukin-2 po interakci s IL-2-R vede ke zvýšené expresi receptorů pro hematopoetické růstové faktory (receptor pro interleukin-3, receptory pro GM-CSF) na CLL lymfocytech, a stimuluje tak jejich proliferaci. Ke zvýšení exprese IL-2-R na maligních lymfocytech dochází právě vlivem TNF- α (185). TNF- α také u CLL prohlubuje anémii a trombocytopenii, a to svým přímým inhibičním vlivem na erytroidní a megakaryocytární linii v kostní dřeni (6, 203). Některé práce naznačily, že TNF- α může u CLL sloužit jako nepříznivý prognostický faktor spojený s negativními ukazateli a značící horší klinický průběh CLL (blíže viz. kapitola 8.1 Prognostický význam sérových koncentrací TNF- α (6, 204, 205, 206).

4.3 Transformující růstový faktor beta, jeho receptory a význam u chronické lymfocytární leukemie

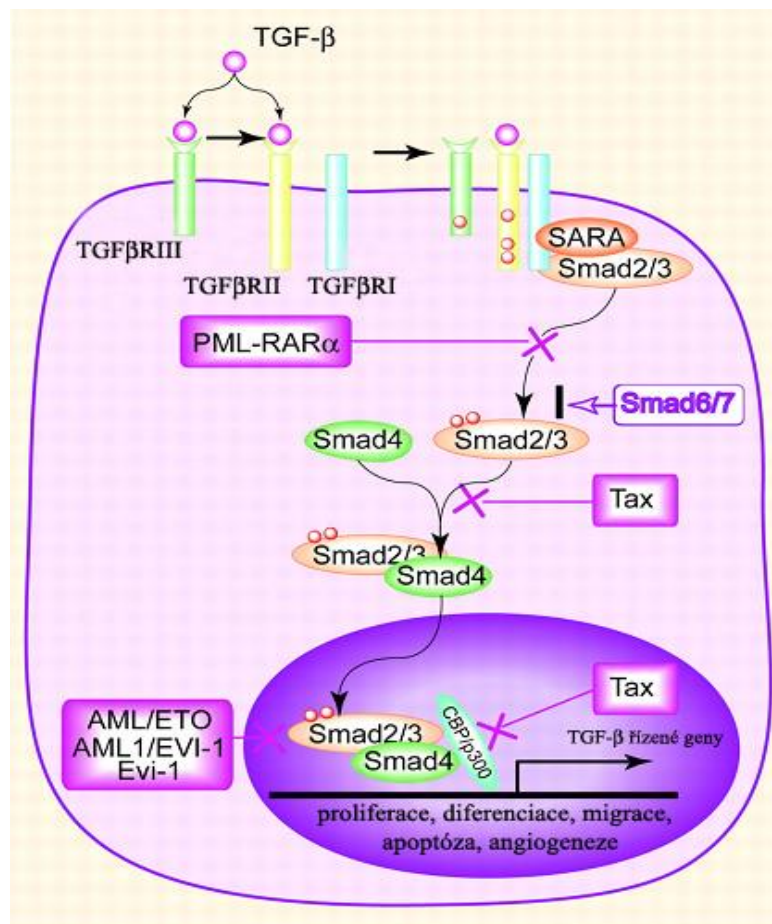
4.3.1 Transformující růstový faktor beta a jeho receptory obecně

Transformující růstový faktor beta (TGF- β) patří do rodiny TGF- β proteinů zahrnující 3 izoformy kódované různými geny – TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Exprese izoform je tkáňově specifická; nejvíce se vyskytující a nejlépe prostudovaným je TGF- β 1, jehož zdrojem jsou zejména trombocyty (7, 140). Dosud bylo nalezeno 6 typů specifických povrchových buněčných receptorů zprostředkujících funkci těchto proteinů. Stěžejní pro TGF- β signalizaci jsou vysokoafinní typ I a typ II receptorů (TGF β RI a TGF β RII), které svými intracelulárními doménami působí jako serin/threonin specifické proteinové kinázy. Důležitou roli sehrávají také koreceptory – typ III receptoru pro TGF- β (TGF β RIII) a endoglin. TGF β RIII je membránový glykoprotein (označovaný také jako betaglykan), který je zodpovědný za prezentaci TGF- β typu II TGF- β receptoru. Endoglin je součástí receptorového komplexu pro TGF- β a je hlavním koreceptorem na endotelových a hematopoetických buňkách. Účastní se vývoje a remodelace cév tím, že ovlivňuje buněčnou odpověď na TGF- β prostřednictvím interakcí s TGF- β receptory. TGF- β se může vázat přímo, nebo prostřednictvím koreceptoru TGF β RIII, na TGF β RII, který poté formuje heterokomplexy s TGF β RI. Po vytvoření heterokomplexu transfosforuluje TGF β RII typ I receptoru, a stimuluje tak jeho kinázovou

aktivitu. Aktivovaný TGFβRI vede k fosforylaci a aktivaci transkripčních cytoplazmatických faktorů Smad2 a Smad3 v sekvenci Ser-Ser-X-Ser v C-koncové MH2 oblasti. Proteiny Smad3 se poté po vytvoření komplexů se Smad4 proteiny translokují do buněčného jádra, kde regulují transkripci TGF-β řízených genů (7, 134, 140, 207) (Obr. 4).

Obrázek 4. Signalizační dráha TGF-β

TGF-β se váže buď přímo, nebo prostřednictvím koreceptoru TGFβRIII na TGFβRII, který formuje heterokomplexy s TGFβRI. Aktivovaný TGFβRI vede k fosforylaci a aktivaci transkripčních cytoplazmatických faktorů Smad, které po translokaci do buněčného jádra regulují transkripci TGF-β řízených genů. Na obrázku je dále zachycena role onkoproteinů inhibujících signální cestu TGF-β prostřednictvím inhibice Smad proteinů u některých typů akutních myeloidních leukemií. Převzato a upraveno dle Dong, M., et al., Role of transforming growth factor-β in hematologic malignancies. 2006 (7).



Funkcí TGF-β proteinů je zejména kontrola buněčné proliferace, diferenciace, migrace a apoptózy (207). TGF-β potencují apoptózu - po jejich působení byla prokázána snížená exprese inhibitorů apoptózy, proteinů Bcl-2 a Bcl-XL. Mechanismem zániku buňky vyvolané účinkem TGF-β je zvýšení průchodnosti mitochondriálních membrán vlivem reaktivních forem kyslíku a následná aktivace cytoplazmatických apoptických enzymů kaspáz.

Transformující růstový faktor beta má na většinu typů buněk (epiteliální, endotelové, hematopoetické buňky, fibroblasty) anti-proliferativní účinek. Komplexy Smad3/4 proteinů brzdí transkripci genů kódujících cyklin-dependentní kinázu, což vede k zástavě přechodu buněčného cyklu z G1 do proliferační S fáze a kumulaci buněk v G0/G1 fázi (140, 208). Právě signalizační cesta TGF- β představuje jeden z hlavních anti-proliferativních a pro-diferenciačních signálů pro progenitorové hematopoetické buňky. Ty jsou samy schopny vylučovat TGF- β , v regulaci hematopoezy je tedy patrné jeho autokrinní působení (7). Další z funkcí TGF- β proteinů je kontrola produkce extracelulární buněčné hmoty, úlohu hrají také v angiogenezi a imunitních dějích. Zde působí převážně imunosupresivně, čímž inhibují protinádorové imunitní mechanismy (například inhibice aktivace NK-buněk, LAK buněk [lymphokine-activated killer cells] a tkáňových makrofágů, inhibice aktivace a proliferace zralých T-lymfocytů (blokuje produkci IL-2, na které je proliferace T-lymfocytů závislá), inhibice proliferace B-lymfocytů a inhibice syntézy IgM a IgG protilátek) (7, 29, 140, 180, 207, 208, 209). TGF- β je důležitým aktivátorem angiogeneze, indukuje novotvorbu cév *in vitro* i *in vivo*. I když inhibuje proliferaci endotelových buněk, vede k sekreci hlavních angiogenních faktorů, a to FGF-2 a VEGF, které proliferaci endotelií stimulují (140, 141). Také koreceptor pro TGF- β endoglin má v angiogenezi důležitou roli (134).

TGF- β je intenzivně studován v souvislosti s rozvojem některých solidních nádorů i hematologických malignit. Předpokládá se, že v počátečních fázích působí jako inhibitor nádorového procesu, u pokročilých nádorů pak ale přispívá neovaskularizací a produkcí extracelulární matrix k jejich disseminaci a oslabením imunitního dozoru k další progresi. U solidních nádorů se s progresí choroby většinou také zvyšuje produkce TGF- β a jeho zvýšená hladina je poté negativním prognostickým faktorem (140). V pokročilých stádiích se navíc nádorové buňky stávají často odolnými na anti-proliferační a pro-apoptické působení tohoto cytokinu i přesto, že je jeho produkce (i samotnými nádorovými buňkami) většinou vysoká. Dalším mechanismem působení TGF- β v kancerogenezi je aktivace signální dráhy NF- κ B stimulující zvýšené přežívání nádorových buněk (140, 210). U Ph-negativních (Philadelfský chromozom) myeloproliferativních onemocnění je TGF- β mimo jiné hlavním faktorem vedoucím k fibróze kostní dřeně v pokročilých stádiích onemocnění (7, 211).

4.3.2 Transformující růstový faktor beta a jeho receptory u CLL

Také u CLL hraje signální dráha TGF- β důležitou roli. Buňky CLL vylučují TGF- β a jeho zvýšené koncentrace v séru/plazmě lze u pacientů s CLL prokázat (8, 9, 122, 212, 213, 214,

215). Lagneaux et al. zjistili, že produkce TGF- β maligními B-lymfocyty je konstitutivní (214). Leukemické buňky nesou na svém povrchu oba typy hlavních receptorů (typ I i II) pro TGF- β (177, 186, 211). Zdrojem TGF- β u CLL nejsou pouze maligní lymfocyty, ale vylučují jej i stromální buňky kostní dřeně. Jde zejména o makrofágy, adipocyty, fibroblasty a další buňky zajišťující tvorbu extracelulární buněčné hmoty, které jsou také zdrojem cytokinů i růstových hematopoetických faktorů. U CLL produkují stromální buňky významně vyšší hladiny TGF- β než stromální buňky zdravé kostní dřeně. TGF- β vede poté přímo i prostřednictvím snížení produkce interleukinu-6 (IL-6) stromálními buňkami k potlačení aktivity hematopoetických prekurzorů v kostní dřeni, a přispívá tak k selhání dřeně v pokročilých stádiích CLL (216). Interleukin-6 navíc u CLL inhibuje TNF- α zprostředkovanou proliferaci, snížení jeho hladin vlivem TGF- β vede tedy ke zvýšení proliferací aktivity CLL buněk (29). Na imunosupresi u CLL se kromě negativního vlivu TGF- β na hematopoetické prekurzory podílí i jeho přímý inhibiční vliv na buňky imunitního systému (viz. výše).

Role TGF- β v patogenezi CLL je kontroverzní a není snadné ji jednoznačně definovat - u většiny pacientů s CLL (zejména v méně pokročilých stádiích) může autokrinní produkce TGF- β přispívat k nastartování apoptózy a inhibici proliferace maligních B-lymfocytů, pomalejší progresi a indolentnímu průběhu onemocnění. Některé práce potvrdily tuto teorii průkazem významně vyšších sérových/plazmatických koncentrací TGF- β v časných a intermediárních stádiích dle Raije (0-II) v porovnání se stádiem pokročilými (III a IV) (8, 9, 217). Ke stejnému závěru dospěli Ho et al., v jejichž práci byla exprese TGF- β hodnocena v kostní dřeni (217). Přesto ale asi 1/3 pacientů s CLL zůstává i v případech vysoké sekrece TGF- β vůči anti-proliferacímu působení TGF- β odolná (29, 211, 218). Na rozdíl například od akutních leukemií či chronické myeloidní leukemie, kde je rezistence na působení TGF- β způsobena poruchou funkce Smad proteinů (blokace vazby Smad3 na DNA, blokace fosforylace Smad2/3, mutace Smad4 proteinu a další), je však u CLL hlavním mechanismem odolnosti vůči TGF- β patologie receptorů TGF β R na leukemických buňkách (7, 211, 214, 218, 219). Genetické defekty (nejčastěji mutace či delece), a to zejména TGF β RI, vedou ke snížení či ztrátě jeho exprese či k funkčním poruchám v TGF β R signalizaci navzdory normální expresi receptoru (receptor je například nestabilním proteinem, nebo dochází k poruchám vazby ligandu na TGF β RI/II/III, k poruchám fosforylace receptoru apod.) (140, 211, 218, 219). Zdá se, že snížení či ztráta exprese TGF β R ovlivňuje zejména anti-proliferací vliv TGF- β , ale pravděpodobně nemusí mít efekt na jeho pro-apoptické působení. Toto zjištění podpořila práce Douglase et al., ve které podání TGF- β nevedlo k vyvolání

apoptózy i přes normální expresi TGF β RII na leukemických buňkách (srovnatelnou s expresí na normálních lymfocytech). Vyslovena byla hypotéza, že porucha TGF- β indukované apoptózy může mít příčinu v jiných „oblastech“ signální dráhy TGF- β včetně strukturálních, nikoliv kvantitativních změn TGF β R (186). K obdobným závěrům dospěla i práce Lagneaux et al., v níž rezistence na anti-proliferaci působení po podání TGF- β byla spojena s nízkou expresí TGF β R, ale porucha pro-apoptické funkce TGF- β byla zaznamenána ve všech případech včetně těch s normální expresí TGF β R (218). Ztráta citlivosti vůči působení TGF- β představuje pro buňky CLL růstovou výhodu, a přispívá tak k jejich klonální expanzi a může vést k progresi a agresivnějšímu průběhu CLL (209, 211, 218).

4.4 Fibroblastový růstový faktor-2, jeho receptory a význam u chronické lymfocytární leukemie

4.4.1 Fibroblastový růstový faktor-2 a jeho receptory obecně

Fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2, dříve označován jako bazický fibroblastový růstový faktor, bFGF) patří do skupiny FGF proteinů zahrnující nejméně 20 strukturálně podobných členů (125, 131, 220). FGF-2 byl objeven v roce 1940 Hoftmanem jako substance potencující růst fibroblastů a poprvé izolován z hovězí hypofýzy v roce 1975 Gospodarowitzem (128, 221). Jde o heparin vázající polypeptid existující v několika izoformách. Buňky nejčastěji vylučují (zatím ne zcela jasným mechanismem) nízkomolekulární 18 kDa variantu, která je jinak skladována v cytoplazmě, existují však také vysokomolekulární varianty FGF-2 (22 a 24 kDa), které vylučovány nejsou, zůstávají součástí buněčného jádra a působí nezávisle na FGF receptorech (viz. dále) (125, 131, 220). FGF-2 je secernován různými typy buněk neuroektodermálního a mezodermálního původu včetně stromálních buněk kostní dřeně, endotelií a některých hematopoetických elementů. V kostní dřeni je skladován jako součást extracelulární matrix (222). Parakrinní i autokrinní funkce FGF-2 je zprostředkována nízkomolekulární secernovanou variantou a uplatňuje se po vazbě na vysokoafinní receptory; existují 4 typy (FGFR1-4). FGF-2 se váže na jejich extracelulární část sestávající ze tří odlišných imunoglobulinových domén (D1-3), což vede k aktivaci intracelulární části receptoru s funkcí tyrosin-kinázy následovanou spuštěním nitrobuněčné signalizace. V signalizaci se uplatňují MEK/ERK kinázy (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) (125, 220). FGF-2 upřednostňuje vazbu na typ 2 receptoru, konkrétně na FGFR2-IIIc (131). Funkce FGF proteinů je regulována i nízkoafinními receptory -

polychacharidy, jež jsou součástí povrchových heparan-sulfát proteoglykanů (223). Hlavní funkcí FGF-2 je úloha mitogenní a anti-apoptická. Mitogenní aktivita FGF-2 není specifická pouze pro endotelie (jde o jeden z nejdůležitějších aktivátorů angiogeneze), ale působí také na fibroblasty nebo epiteliální buňky (117, 131). Allouche et al. ve svých pracech popsali i funkci FGF-2 coby hematopoetického růstového faktoru, pro který hematopoetické buňky exprimují receptory. FGF-2 také vykazuje synergický účinek s hematopoetickými růstovými cytokiny (222, 224). Fibroblastový růstový faktor-2 blokuje apoptózu neurálních buněk, anti-apopticky působí i na nádorové lymfocyty u CLL (9, 10, 28, 131). Anti-apoptickému působení FGF-2 na maligní lymfocyty je podrobně věnována pozornost v kapitole 4.4.2 Fibroblastový růstový faktor-2 a jeho receptory u CLL.

4.4.2 Fibroblastový růstový faktor-2 a jeho receptory u CLL

Jako první popsal zvýšení sérového FGF-2 jakožto důležitého angiogenního aktivátoru u pilotního souboru 18 pacientů s CLL Duensing v roce 1995 (120). Zvýšené sérové/plazmatické koncentrace FGF-2 i VEGF u pacientů s CLL (i u většiny ostatních hematologických malignit) byly poté potvrzeny i dalšími autory (9, 10, 11, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 225, 226, 227). Aguayo et al. prokázali, že plazmatické koncentrace FGF-2 byly u CLL nejvyšší ze všech vyšetřovaných hematologických onemocnění (akutní lymfoblastická a myeloidní leukemie, chronická myeloidní a myelomonocytární leukemie, myelodysplastický syndrom) (126). Bylo zjištěno, že zdrojem angiogenních cytokinů FGF-2 a VEGF u CLL jsou i samotné maligní lymfocyty, i když značnou měrou k produkci přispívají také fibroblasty kostní dřeně a endotelové buňky, a to zejména v případě FGF-2 (119, 120, 125, 228). Krejčí et al. v pokusu *in vitro* prokázali, že maligní B-lymfocyty CLL jsou schopné syntetizovat vysokomolekulární 22 a 24 kDa varianty i nízkomolekulární 18 kDa variantu FGF-2 a tuto také secernovat z cytoplazmy buněk do média (125). Dalším důležitým nálezem je vedle produkce angiogenních faktorů také exprese pro ně určených receptorů CLL buňkami, čímž je zajištěna i autokrinní stimulace novotvorby cév. Zatím byla u CLL jednoznačně ověřena exprese receptorů pro VEGF včetně jejich solubilní formy a v rámci klinických studií již byly použity inhibitory jejich tyrosin-kinázové aktivity (128, 129, 130). K dispozici je však velmi omezené množství prací zkoumajících expresi FGFR na leukemických buňkách CLL. V roce 1995 popsali Allouche et al. expresi FGF receptorů typu 1, 3 a 4 na leukemických buňkách myeloidní i lymfoidní linie. Žádná z použitých buněčných linií však neexprimovala typ 2 receptoru, který je pro vazbu FGF-2 dominantní (224). Také

starší práce Armstrongové et al. potvrdila expresi FGFR 1, 3 a 4, nikoliv FGFR2, na různých typech leukemických buněk (229). Zatím nejrozsáhlejší publikací týkající se problematiky exprese FGFR konkrétně u CLL je práce Krejčí. Krejčí et al. prokázali expresi všech 4 typů FGFR na leukemických CLL lymfocytech, nejsilněji (ve 100 % případů) byl exprimován typ FGFR1IIIc, velmi slabě naopak FGFR3IIb a oba typy FGFR2 (IIb i IIIc). V této práci bylo také zjištěno, že exogenně podaný FGF-2 se *in vitro* (na rozdíl od leukemických buněk u chronické myeloidní leukemie) váže na leukemické lymfocyty CLL velmi slabě a že nevede k aktivaci MEK/ERK. Z tohoto nálezu by bylo možné vyvodit závěr, že autokrinní aktivita FGF-2 je na rozdíl od VEGF u CLL méně pravděpodobná. Sami autoři však připouštějí, že *in vivo* je situace odlišná a autokrinní aktivitu FGF-2 vyloučit nelze (125). Navíc bylo opakovaně ověřeno, že FGF-2 působí na maligní CLL lymfocyty anti-apopticky, a to i přímou vazbou na FGFR (resp. FGFR1), což jeho autokrinní vliv podporuje (28, 230, 231, 232). I König et al. zjistili silnou expresi typu 1 FGFR na leukemických CLL lymfocytech (230). Jiné práce týkající se exprese FGFR na leukemických lymfocytech CLL nebyly v databázi PubMed nalezeny.

Anti-apoptické působení FGF-2 na maligní lymfocyty se děje minimálně dvěma mechanismy. Bylo zjištěno, že zvýšené sérové koncentrace FGF-2 korelují s vyšší expresí anti-apoptického proteinu Bcl-2 CLL buňkami (nebyla však prokázána korelace pro VEGF), a tím mohou přispívat k jejich prodlouženému přežívání. Ke stimulaci exprese Bcl-2 leukemickými lymfocyty dochází díky jejich kontaktům se stromálními buňkami pomocí adhezivních receptorů, například $\alpha\beta 1$ integrinu, který zajišťuje vazbu leukemických lymfocytů na fibronectin, jež je součástí extracelulární matrix. Exprese adhezivních molekul je stimulována právě působením FGF-2 (28, 233). FGF-2 však vedle ovlivnění exprese adhezivních receptorů vede i přímé stimulaci exprese Bcl-2 CLL buňkami, což podporuje jeho autokrinní aktivitu. Tento efekt prokázali König et al. v roce 1997. Přidání exogenního FGF-2 k CLL buněčným kulturám vedlo prostřednictvím vazby na vysokoafinní FGFR1 k významnému zvýšení produkce Bcl-2 CLL buňkami a bylo mimo jiné spojeno se selháním apoptózy po podání fludarabinu, který naopak bez přítomnosti FGF-2 apoptózu CLL buněk vyvolal (230). To, že FGF-2 vede k selhání apoptózy po podání fludarabinu, prokázala již studie Menzela et al. v roce 1996, i když mechanismus tohoto jevu na rozdíl od Königa zkoumán nebyl. V práci Menzela byly s rezistencí na fludarabin a se zvýšeným přežíváním CLL buněk spojeny zvýšené hladiny intracelulárního FGF-2. Také přidání exogenního FGF-2 k buňkám s jinak nízkým intracelulárním FGF-2 vedlo k selhání apoptózy indukované fludarabinem. Na základě této práce byla potvrzena schopnost maligních lymfocytů CLL produkovat

intracelulární FGF-2 a také fakt, že intracelulární i exogenně podaný FGF-2 mají na buňky CLL stejný anti-apoptický účinek (231). Druhým popsáním anti-apoptickým mechanismem FGF-2 je potlačení aktivace jednoho z nejdůležitějších nádorových supresorových proteinů p53, a to zvýšením exprese p53 inhibitoru MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) (232). Vyšší sérové/plazmatické koncentrace FGF-2 jsou v některých studiích spojeny s nepříznivým průběhem CLL (pokročilým klinickým stádiem, vyšším počtem leukocytů i lymfocytů v periferní krvi a progresí CLL) (9, 28, 120). V již citované práci Menzela et al. byla také prokázána souvislost zvýšených hladin intracelulárního FGF-2 v CLL buňkách a pokročilým klinickým stádiem (231). Některé práce ukázaly, že cirkulující FGF-2 a TGF- β klesají po intenzivní léčbě purinovými analogy (121, 122).

5. Pracovní hypotézy a cíle disertační práce

5.1 Pracovní hypotézy

Vzhledem k literárním údajům lze očekávat zvýšenou aktivitu signální dráhy NF- κ B, kterou chceme ověřit zvýšením sérových koncentrací TNF- α u pacientů s CLL. TNF- α je typickým produktem aktivované dráhy NF- κ B u CLL; dle dostupných dat by měl být u CLL negativním prognostickým ukazatelem a souviset s rapidnějším klinickým průběhem.

Předpokládali jsme také zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných s CLL - dle publikovaných prací by hladiny měly být vyšší v méně pokročilých stádiích (časných a intermediárních stádiích dle Raie) a odpovídat pomalejšímu průběhu nemoci, a to beze změn exprese povrchového receptoru pro TGF- β .

Zejména u nemocných s nepříznivým průběhem CLL očekáváme změnu exprese povrchového TGF β RII na lymfocytech CLL (snížení či ztrátu exprese), čímž lze zdůvodnit ztrátu citlivosti vůči anti-proliferačnímu působení TGF- β . Pro hodnocení jsme zvolili TGF β RII z toho důvodu, že TGF- β je jeho přímým ligandem a neporušená funkce TGF β RII je po vazbě na TGF β R1 nezbytná pro aktivaci celé signální dráhy TGF- β .

Dále předpokládáme nález zvýšených sérových koncentrací FGF-2 u nemocných s CLL jako jednoho z nejdůležitějších aktivátorů angiogeneze a proteinu s anti-apoptickým působením, a to opět zejména u skupiny pacientů s méně příznivým průběhem onemocnění.

Očekáváme průkaz exprese FGFR2 na CLL buňkách, nutného pro autokrinní působení FGF-2, která by dle dostupných literárních údajů měla být spíše nižší. K hodnocení byl FGFR2 zvolen z toho důvodu, že by měl být pro vazbu FGF-2 dominantní.

5.2 Cíle disertační práce

Cílem naší práce bylo:

1. Stanovit vybrané ukazatele apoptózy a angiogeneze, které by dle dosavadních znalostí mohly sloužit jako další nové prognostické faktory u CLL. K hodnocení jsme zvolili stanovení sérových koncentrací TNF- α , TGF- β 1 a FGF-2 a stanovení exprese TGF β RII a FGFR2 na lymfocytech u pacientů s CLL v porovnání se zdravými dobrovolníky;

2. Zhodnotit vztah vybraných ukazatelů apoptózy a angiogeneze k prognostickým faktorům (klasickým jako je pohlaví, klinické stádium dle Raie, absolutní počet lymfocytů v periferní krvi, LDH, B2M a novým - cytogenetické aberace, IgVH mutační stav, exprese ZAP-70 a exprese CD38 a k přítomnosti masivní lymfadenopatie);
3. Zhodnotit vzájemný vztah ukazatelů apoptózy a angiogeneze;
4. Zhodnotit souvislost ukazatelů apoptózy a angiogeneze s klinickým průběhem onemocnění – progresí choroby, celkovým přežitím (overall survival, OS) a obdobím do zahájení léčby 1. linie (time to treatment, TTT).

6. Nemocní a metody, statistická analýza

6.1 Soubor nemocných

Do studie bylo zařazeno 75 nemocných s chronickou lymfocytární leukémií diagnostikovaných na IV. interní hematologické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové od ledna 2007 do srpna 2010. Před vstupem do studie podepsali všichni nemocní informovaný souhlas a studie byla provedena dle zásad Helsinské deklarace. Žádný z nemocných nebyl v době odběru zjišťovaných ukazatelů léčen. Diagnóza CLL vyžadovala splnění diagnostických kritérií dle mezinárodních doporučení NCI-WG z roku 2008. Dle těchto doporučení byla v našem souboru také definována progredující (aktivní) choroba (s nutností zahájení léčby) (Tab. 5), ostatní případy byly označeny jako stabilní onemocnění (15).

Medián od data stanovení diagnózy do data provedení odběru hodnocených faktorů byl 16,4 měsíce (rozmezí 0,3 – 132 měsíců).

Základní charakteristiky nemocných jsou uvedeny v Tabulce 6.

Do souboru bylo zařazeno 47 mužů (63 %) a 28 žen (37 %) s věkovým mediánem 65 let (rozmezí 38-82 let) v době odběru vybraných ukazatelů. Nízké/střední/vysoké riziko dle modifikovaného Raiova stagingu (stádium 0/ I a II/ III a IV) bylo přítomno u 30/31/14 nemocných (40/41/19 %) (41). Šedesát jedna nemocných (61/75, 81 %) se nacházelo v časných a intermediárních klinických stádiích (stádia 0-II dle Raie), 14 pacientů (14/75, 19 %) mělo pokročilá stádia (stádia III-IV dle Raie). Určení klinických stádií bylo rovněž aktualizováno v době odběru vybraných ukazatelů. Řazení do jednotlivých klinických stádií bylo provedeno na základě vyšetření krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem leukocytů a fyzikálního vyšetření se zaměřením na hmatné uzliny (v oblasti krční, nadklíčkové, podpažní, tříselné a femorální) a velikost jater a sleziny. U všech pacientů bylo provedeno kompletní biochemické vyšetření séra, dále byly zhodnoceny hladiny sérových imunoglobulinů pro posouzení rizika imunosuprese a nutnosti substituce a proveden přímý antiglobulinový test k vyloučení autoimunní hemolytické anémie. V době zařazení do studie byla sérová koncentrace LDH vyšetřena u 71/75 (95 %) nemocných, u 46 pacientů (65 %) byla zvýšena nad horní hranici normy (3,75 μ kat/l). B2M byl vyšetřen u 45/75 (60 %) pacientů, u 36 z nich (80 %) byla sérová koncentrace zvýšena nad horní hranici normy (1,8 μ mol/l). Medián absolutního počtu lymfocytů v periferní krvi v době zařazení do studie byl $38,79 \cdot 10^9/l$ (rozmezí $5 \cdot 10^9$ - $620,7 \cdot 10^9/l$). Vyšetření kostní dřeně punkcí či biopsií bylo provedeno u 42 pacientů, typ infiltrace kostní dřeně však nebyl jako prognostický ukazatel hodnocen. U 36/75

(48 %) pacientů bylo provedeno ultrasonografické vyšetření uzlin a/nebo břicha. Paket uzlin v průměru 5 a více cm (masivní lymfadenopatie; tzv. bulk) byl v době zařazení do studie diagnostikován u 16 nemocných (16/75, 21 %), u 14 z nich (85 %) byl lokalizován nitrobřišně a zjištěn dle UZ vyšetření.

Mutační stav genů pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů (IgVH) byl vyšetřen z nesrážlivé periferní krve reverzně transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) s následnou sekvenací PCR produktů. Mutované IgVH geny měly více než 2 % rozdíl vůči sekvenci odpovídající zárodečné linii. K dispozici bylo hodnocení IgVH u 65/75 (87 %) nemocných. Dvacet šest pacientů (40 %) mělo mutované geny pro IgVH, 39 (60 %) mělo nemutované geny. Podrodina VH3-21 se vyskytla v jednom případě, a to u pacienta s nemutovanými IgVH geny.

Přítomnost cytogenetických aberací byla stanovena pomocí fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) u 68/75 nemocných (91 %) a hodnocena dle Döhnerovy hierarchické klasifikace (71). Delece 13q14 byla nalezena u 19/68 nemocných (28 %), trisomie 12 u 12/68 (18 %), delece 11q u 16/68 (24 %) a delece 17p13 u 5/68 nemocných (7 %). Šestnáct nemocných (16/68; 23 %) nemělo zachyceny žádné změny. Nemocní byli dle cytogenetického nálezu rozděleni do dvou rizikových skupin. Ve skupině s nízkým rizikem a příznivější prognózou byli nemocní s normálním nálezem, izolovanou del 13q14 a trisomií 12 (47/68, 69 %), do skupiny s nepříznivou prognózou patřili nemocní s nálezem del 11q a del 17p13 (21/68, 31 %).

Expresí CD38 byla hodnocena průtokovou cytometrií z periferní krve a za pozitivní považována, pokud byla vyšší než 30 %. Byla vyšetřena u 72/75 nemocných (96 %) a pozitivní byla v 19 případech (26 %). Expresí ZAP-70 byla též hodnocena průtokovou cytometrií z periferní krve (za použití monoklonální protilátky značené fykoerytrinem klonu 1E7.2 firmy Caltag, USA) a jako ZAP-70 pozitivní případy byly považovány ty, kde bylo pozitivních více než 20 % buněk. Osmnáct nemocných ze 72 hodnocených (25 %) bylo ZAP-70 pozitivních.

Tab. 5. Kritéria progredující/aktivní choroby (15).

Průkaz progresivního selhání kostní dřeně (projevující se rozvojem <i>nebo</i> zhoršením anémie a/nebo trombocytopenie)
Masivní (tj. > 6 cm pod levým žeberním skloubením) <i>nebo</i> progresivní <i>nebo</i> symptomatická splenomegalie
Masivní (tj. > 10 cm v nejdelším rozměru) <i>nebo</i> progresivní <i>nebo</i> symptomatická lymfadenopatie
Progresivní lymfocytóza se vzestupem > 50 % po dobu 2 měsíců <i>nebo</i> LDT kratší než 6 měsíců
Autoimunitní anémie <i>a/nebo</i> trombocytopenie špatně odpovídající na kortikosteroidy nebo jinou standardní léčbu
Přítomnost minimálně jednoho z následujících příznaků souvisejících s onemocněním: <ul style="list-style-type: none"> a) nechtěný úbytek hmotnosti ≥ 10 % v průběhu předchozích 6 měsíců b) významná únava (tj. výkonnostní stav ECOG PS 2 nebo horší, nemožnost pracovat nebo provádět obvyklé činnosti) c) horečky nad 38 °C po dobu 2 nebo více týdnů bez průkazu infekce d) noční pocení po dobu delší než 1 měsíc bez průkazu infekce

Tab. 6. Deskriptivní charakteristiky nemocných.

Celkový počet nemocných	75
Muži/ženy	47/28 (63 %/37 %)
Medián věku (rozmezí)	65 let (38-82)
Nízké riziko (Rai 0)	30/75 (40 %)
Střední riziko (Rai I, II)	31/75 (41 %)
Vysoké riziko (Rai III/IV)	14/75 (19 %)
Progredující onemocnění	36/75 (48 %)
Sérová LDH zvýšená	46/71 (65 %)
Sérový B2M zvýšený	36/45 (80 %)
Medián ALC (rozmezí)	38,79.10 ⁹ /l (rozmezí 5.10 ⁹ -620,7.10 ⁹ /l)
Masivní lymfadenopatie (nad 5 cm)	16/75 (21 %)
Nemutované IgVH geny	39/65 (60 %)
Nepříznivé cytogenetické aberace dle FISH	21/68 (31 %)
Expres ZAP-70 pozitivní	18/72 (25 %)
Expres CD38 pozitivní	19/72 (26 %)

6.2 Použité metody ke stanovení vybraných ukazatelů apoptózy a angiogeneze

Odběry krve ke zhodnocení vybraných ukazatelů byly provedeny buď v době stanovení diagnózy CLL, nebo kdykoliv v průběhu onemocnění, které vykazovalo v době odběru stabilní průběh bez známek progresu. Medián od data stanovení diagnózy do data provedení odběru byl 16,4 měsíce (rozmezí 0,3 – 132 měsíců). Hodnocení klasických prognostických faktorů (Rai stádia, ALC, LDH, B2M) a přítomnosti masivní lymfadenopatie bylo pro účely statistického zpracování provedeno v době odběru zkoumaných ukazatelů. Moderní ukazatele byly vyšetřeny při zařazení do studie pouze v případě, že nebyly k dispozici v době stanovení diagnózy CLL.

Data týkající se vybraných ukazatelů apoptózy a angiogeneze byla dostupná u všech nemocných v souboru ($n = 75$), pouze sérové koncentrace FGF-2 byly zhodnoceny u 72/75 (96 %) nemocných.

Vyšetření sérových koncentrací TNF- α a TGF- β 1 bylo pro srovnání provedeno u skupiny 57 dobrovolných zdravých dárců krve (26 mužů a 31 žen, medián 35 let; rozmezí 19-51 let) a vyšetření sérových koncentrací FGF-2 u skupiny 40 dobrovolných zdravých dárců krve (24 mužů a 16 žen, medián 39,5 let; rozmezí 24-69 let). Stanovení exprese TGF β R2 a FGFR2 na lymfocytech poté u 10 dobrovolných zdravých dárců krve (6 mužů a 4 ženy, věkový medián 34 let, rozmezí 25-65 let). Vyšetření vybraných ukazatelů u kontrolních skupin bylo provedeno stejnými metodikami jako u pacientů s CLL.

6.2.1 Stanovení sérových koncentrací TNF- α , TGF- β 1 a FGF-2

Z kubitální vény byla odebrána srážlivá krev. Po separaci centrifugací byly vzorky séra zmrazeny na -70 stupňů Celsia. Před vlastním zpracováním byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě. Pro stanovení sérových koncentrací TNF- α , TGF- β 1 a FGF-2 byly použity komerční ELISA soupravy od firmy R&D Systems (USA), a to Quantikine Human TNF-alpha, Quantikine Human TGF- β 1 a Quantikine HS Human FGF basic. Ve všech případech se jednalo o sandwichovou ELISA techniku (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), kde je na povrch mikrotitrační jamky navázána specifická zvířecí protilátka proti stanovovanému parametru (cytokinu). Po přidání vzorku séra dojde k navázání příslušného cytokinu na protilátku. Při následném promytí je zbytek nezreagovaného vzorku odstraněn. Následuje přidání druhé zvířecí protilátky proti stanovovanému cytokinu. Tato druhá protilátka je

označena enzymaticky. Po následném odmytí nezreagované protilátky je množství enzymu v jamce (které odpovídá množství cytokinu ve vzorku) stanoveno pomocí barevné enzymatické reakce. Výsledné zbarvení roztoku v jamce (absorbance) odpovídá množství měřeného cytokinu. V případě soupravy na stanovení FGF-2 označené HS (high sensitivity) je výsledná enzymatická reakce zesílena speciálním amplifikačním činidlem pro dosažení vyšší citlivosti stanovení. Pro měření barevné změny (absorbance) byl použit u všech měřených parametrů ELISA reader Multiskan a software Genesis od firmy Thermo Fisher Scientific. Koncentrace všech měřených cytokinů byly vypočteny z kalibračních křivek.

6.2.2 Stanovení exprese TGFβRII a FGFR2

K hodnocení lymfocytární exprese TGFβRII a FGFR2 byly použity vzorky nesrážlivé periferní krve (odběr do zkumavky s heparinem), které byly po přípravě (viz. níže) měřeny na průtokovém cytometru EPICS XL (Beckman Coulter, USA) se softwarem EPICS XL verze 3.0.

Postup hodnocení exprese TGFβRII byl následující: k 25 ul testované krve ($1 - 2.5 \times 10^5$ buněk) bylo přidáno 10 ul protilátky a vzorek byl inkubován po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Použitou protilátkou byla myší monoklonální protilátka proti lidskému TGFβRII konjugovaná s karboxyfluoresceinem (katalogové číslo FAB241F, R&D Systems, USA). Poté byl přidán lyzační roztok (150 ul, Optilyse C, Beckman Coulter, USA) a vzorek byl inkubován po dobu 10 minut. Po promytí 1,5 ml fyziologického roztoku byl vzorek zcentrifugován (1100 otáček za minutu po dobu 7 minut) a fenotypizován.

Postup hodnocení lymfocytární exprese FGFR2 byl následující: Lyofilizovaná neznačená protilátka (jednalo se o FGFR2 (IIIc), katalogové číslo MAB684, R&D Systems, USA) byla naředěna na 25 ug/ml a 10 ul bylo přidáno k 25 ul testované krve ($1 - 2.5 \times 10^5$ buněk) a inkubováno 15 minut při pokojové teplotě. Po promytí 1 ml fyziologického roztoku byl vzorek centrifugován (1100 otáček za minutu po dobu 7 minut) a po odstranění supernatantu bylo ke zbytku vzorku přidáno 5 ul sekundární protilátky značené FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (katalogové číslo PN IM0819, Beckman Coulter, USA). Po 15 minutové inkubaci při pokojové teplotě bylo přidáno 150 ul lyzačního činidla (Optilyse C, Beckman Coulter, USA) a vzorek se opět inkuboval po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu a po přidání 0,5 ml fyziologického roztoku byla provedena imunofenotypizační analýza buněk ve vzorku.

6.3 Statistická analýza

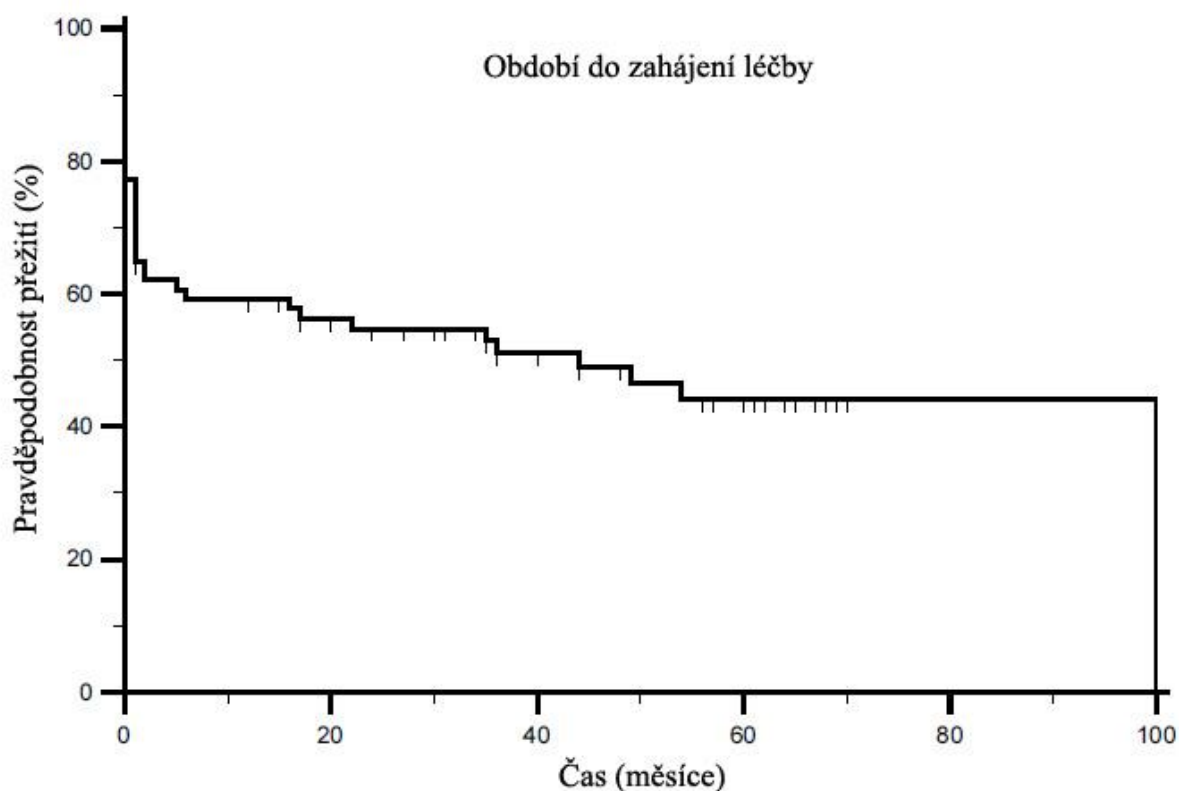
Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Velká Británie). Všechna data byla testována na normalitu Shapirovým-Wilkovým testem. Pokud bylo rozdělení dat normální, byl k testování rozdílů vůči kontrolní skupině použit parametrický t-test. Pokud neměla data normální rozdělení, byl užit neparametrický Mannův-Whitneyův U test. Korelace byla stanovena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (r). Celkové přežití bylo definováno jako období od data odběru vybraných ukazatelů do úmrtí na jakoukoliv, i nenádorovou příčinu. Období do zahájení léčby (time to treatment, TTT) bylo hodnoceno od data provedení odběru do data zahájení léčby 1. linie. K hodnocení OS a TTT byly zkonstruovány Kaplan-Meierovy křivky přežití a jednotlivé podskupiny porovnány pomocí log rank testu. P-hodnoty nižší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

7. Výsledky

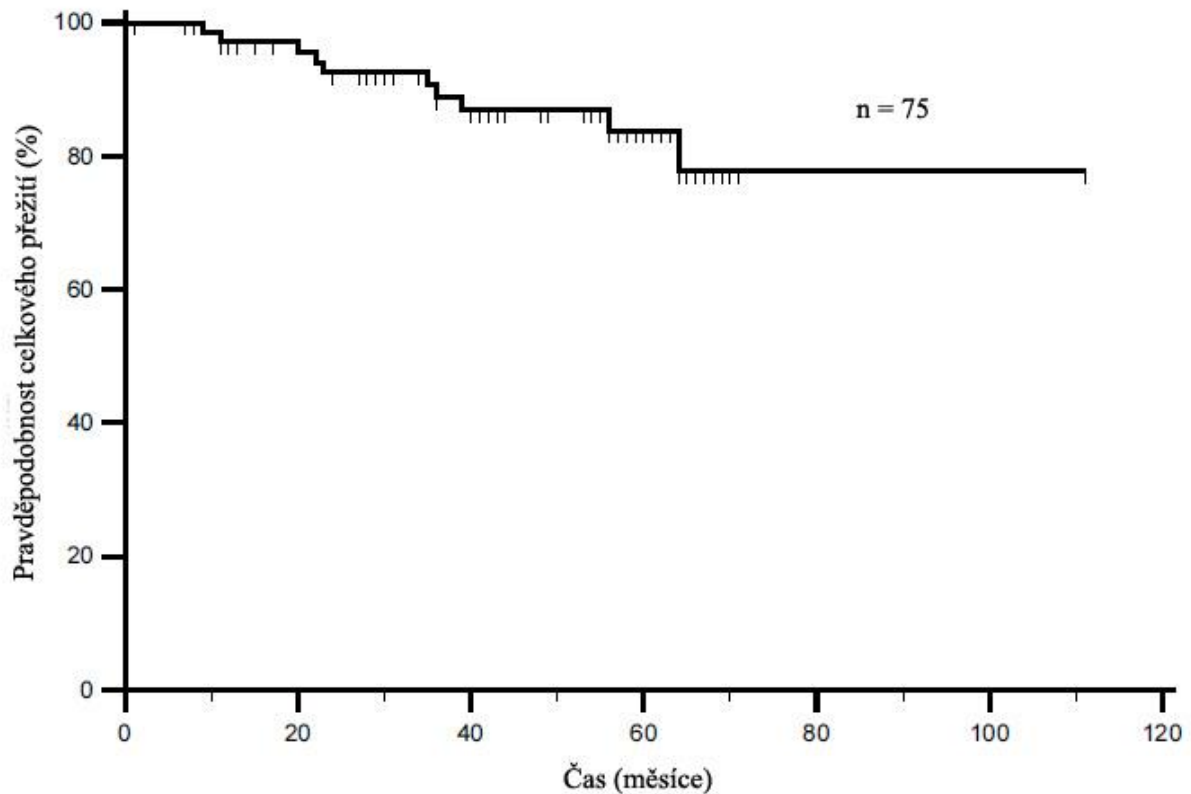
V době analýzy v prosinci 2012 byl medián sledování žijících nemocných 48 měsíců (rozmezí 1-111 měsíců) a stav souboru byl následující: 10 nemocných (13 %) zemřelo, z toho 5 z důvodu progresu CLL. Třicet šest nemocných (48 %) progredovalo a vyžadovalo zahájení léčby. Medián TTT celého souboru byl 44 měsíců (Graf 1). Pravděpodobnost 5-letého přežití celého souboru byla 84 %, medián OS nebyl dosažen (Graf 2).

Přehled nejdůležitějších nálezů pro jednotlivé ukazatele shrnuje Tabulka 7.

Graf 1. Období do zahájení léčby (celý soubor).



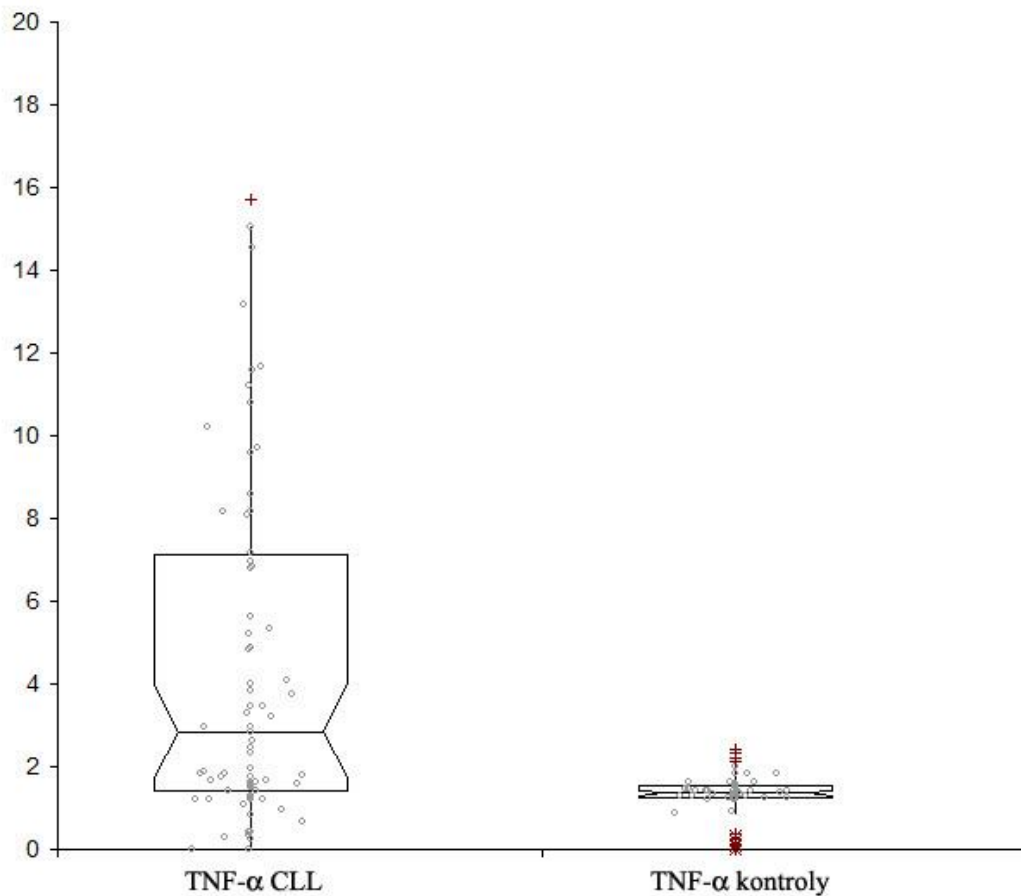
Graf 2. Celkové přežití celého souboru nemocných.



7.1 Hodnocení sérových koncentrací TNF- α a jejich souvislost s prognostickými faktory a klinickým průběhem CLL

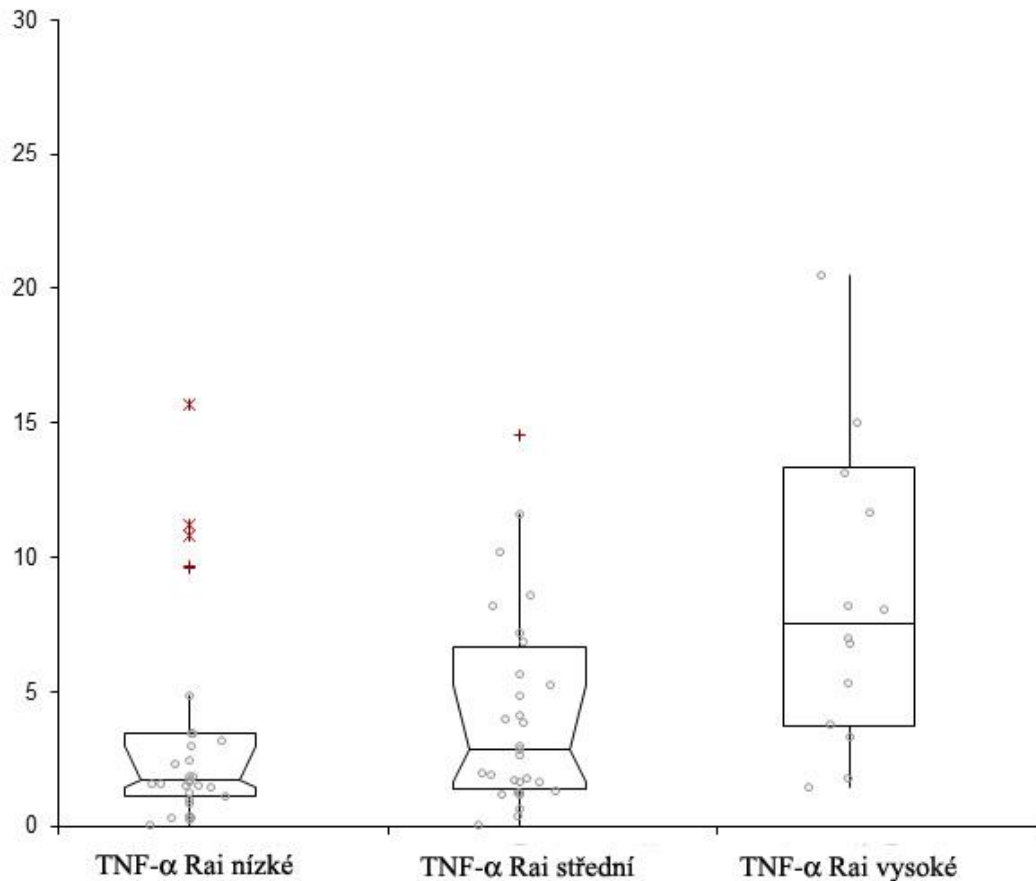
Sérový TNF- α byl detekovatelný ve všech vzorcích. Koncentrace TNF- α byly statisticky významně vyšší u pacientů s CLL (medián 2,83 pg/ml; průměrná sérová koncentrace 5,79 pg/ml) oproti kontrolní skupině (medián 1,37 pg/ml; průměrná sérová koncentrace 1,32 pg/ml) [$p < 0,0001$] (Graf 3).

Graf 3. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



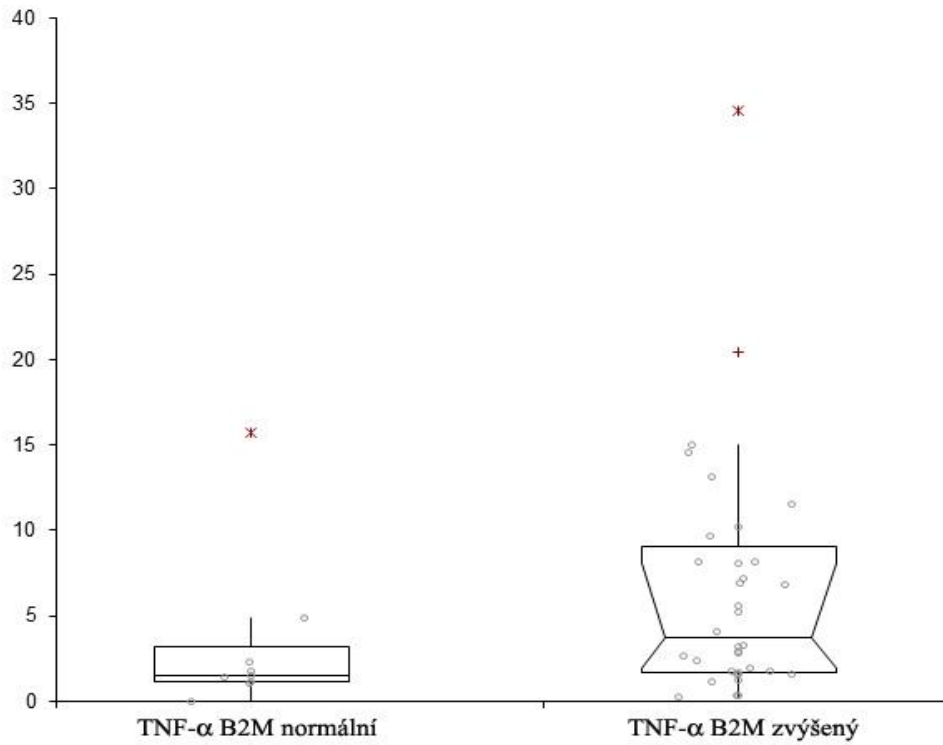
Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v koncentracích TNF- α a mezi muži a ženami ($p = 0,78$). Významně vyšší sérové koncentrace TNF- α měli nemocní ve skupině s vysokým rizikem dle Raie v porovnání se skupinou s nízkým rizikem dle Raie (medián 7,52 vs. 1,69 pg/ml; $p = 0,0008$) i v porovnání se skupinou se středním rizikem dle Raie (medián 7,52 vs. 2,83 pg/ml; $p = 0,0097$). Při srovnání skupiny s nízkým a středním rizikem dle Raie nebyl v koncentracích TNF- α rozdíl ($p = 0,13$) (Graf 4).

Graf 4. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s vysokým rizikem dle Rai e v porovnání se středním i nízkým rizikem. Sérové koncentrace TNF- α se neliší mezi skupinou s nízkým a středním rizikem dle Rai e. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

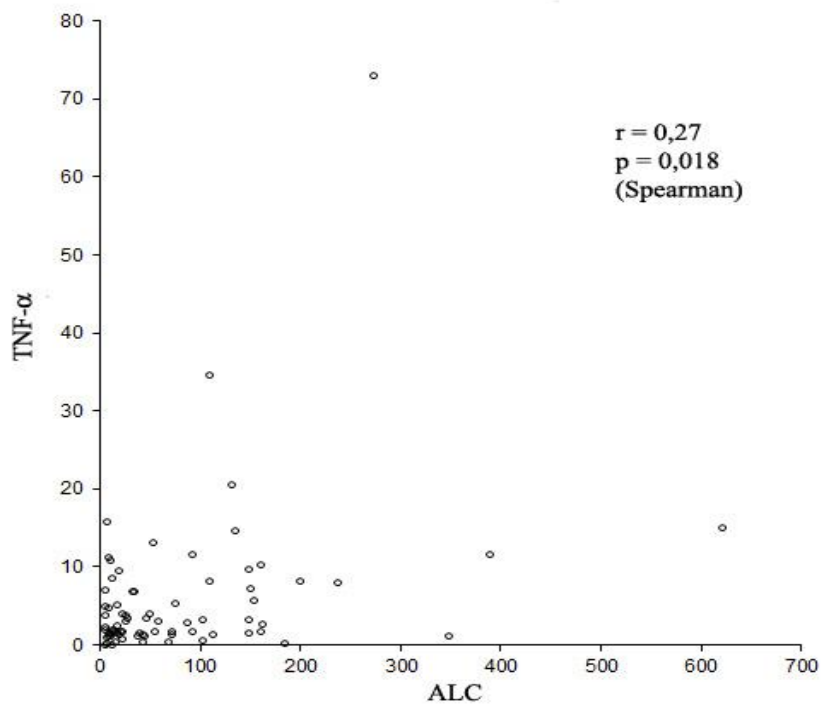


Významný rozdíl nebyl ani mezi skupinami nemocných s rozdílnou koncentrací LDH ($p = 0,14$). U nemocných se zvýšenou hladinou B2M byla sérová koncentrace TNF- α významně vyšší (medián 3,70 vs. 1,54 pg/ml; $p = 0,045$) (Graf 5). S koncentrací TNF- α slabě pozitivně koreloval absolutní počet lymfocytů ($p = 0,018$; $r = 0,27$) (Graf 6). Nemocní s masivní lymfadenopatií měli významně vyšší koncentrace TNF- α než nemocní bez masivní lymfadenopatie (medián 7,0 vs. 1,88 pg/ml; $p = 0,0083$) (Graf 7).

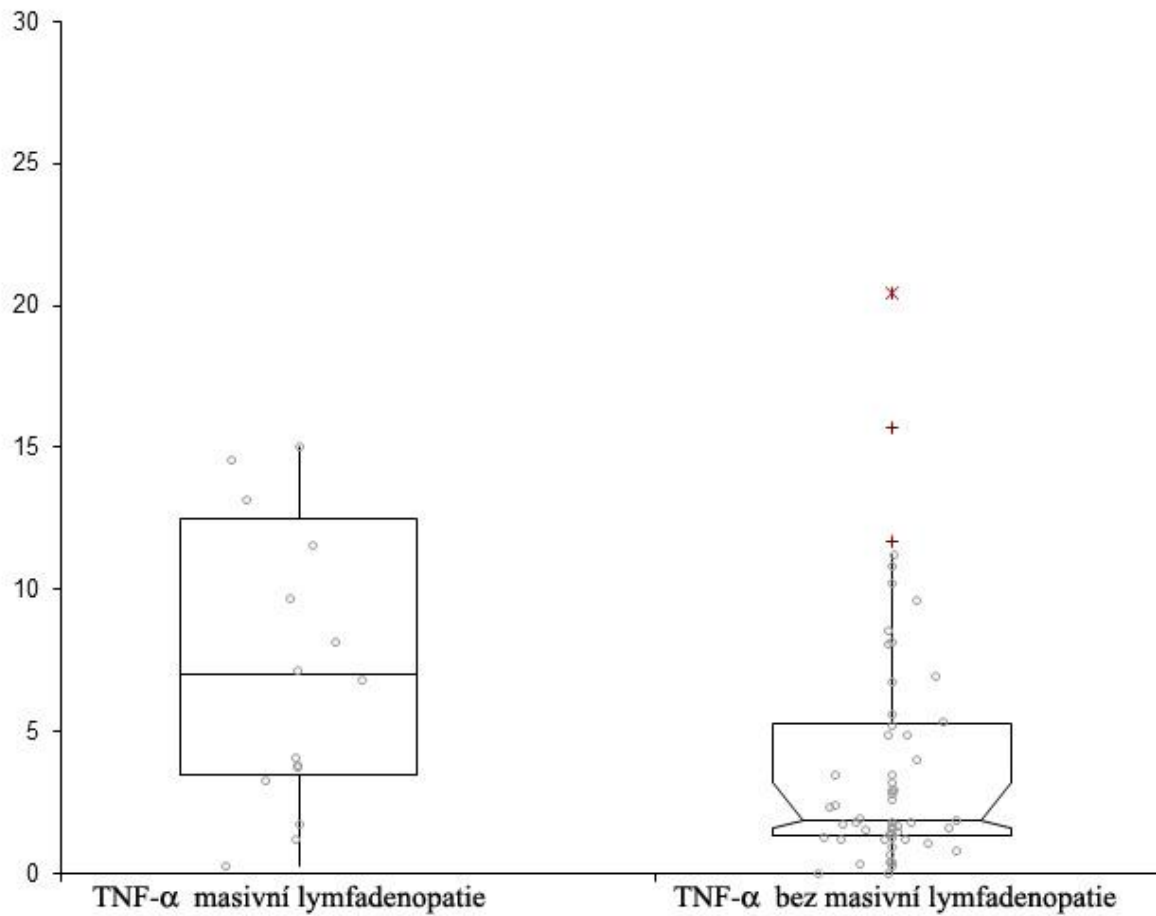
Graf 5. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných se zvýšeným sérovým B2M. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 6. Sérové koncentrace TNF- α slabě pozitivně korelují s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi (ALC). Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

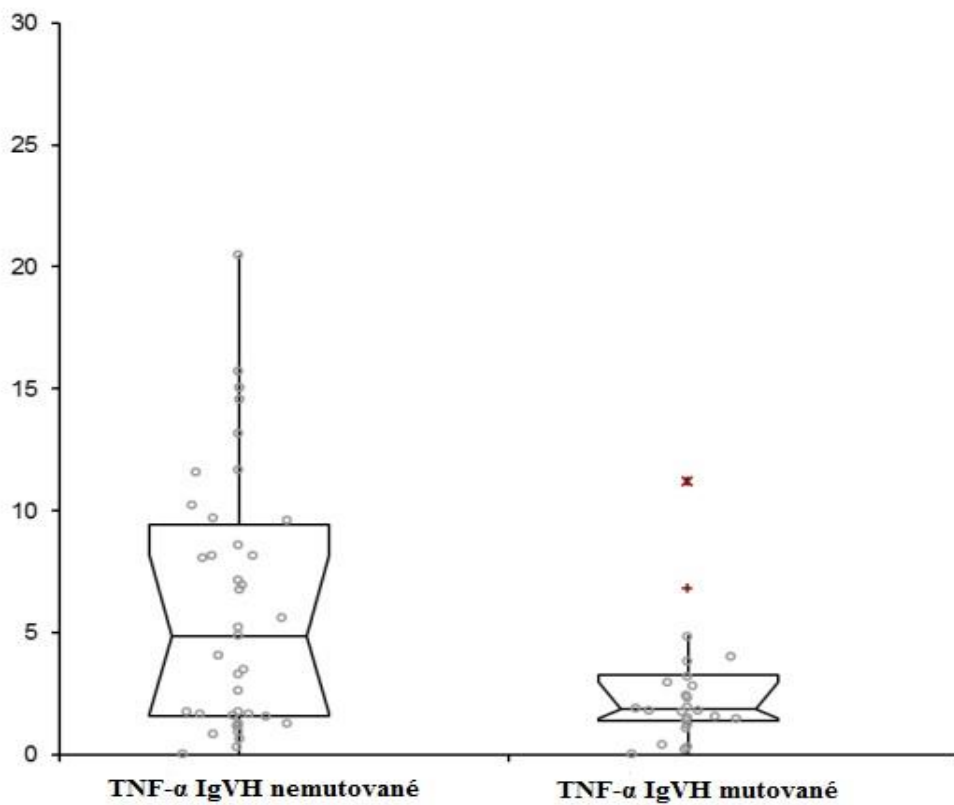


Graf 7. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s masivní lymfadenopatií. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

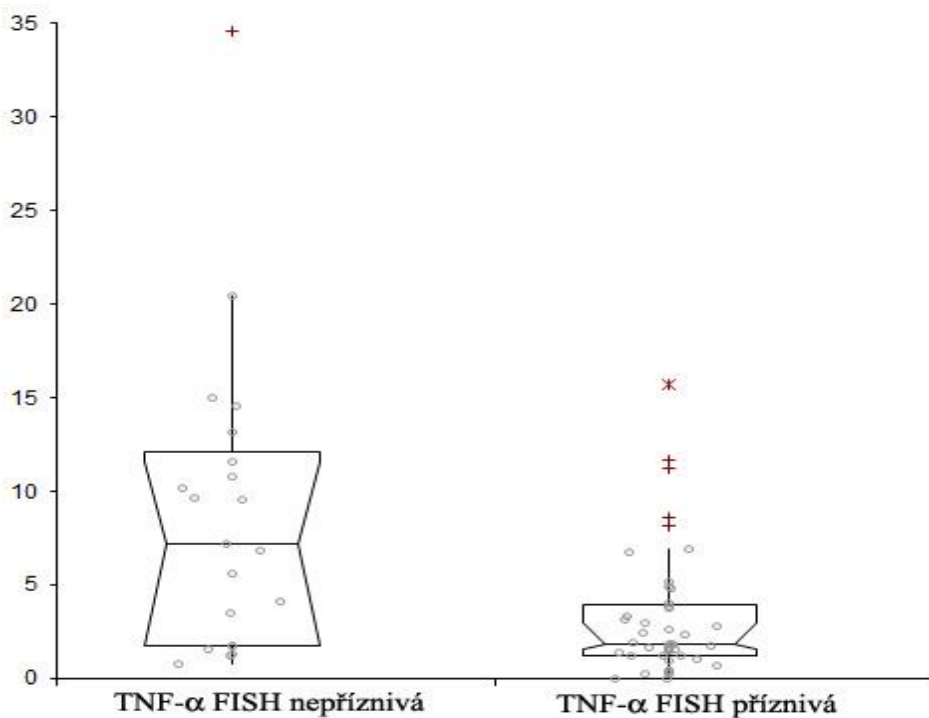


Statisticky významně vyšší sérové koncentrace TNF- α měli pacienti s nemutovanými IgVH geny v porovnání s mutovanými (medián 4,88 vs. 1,86 pg/ml; $p = 0,041$) (Graf 8) a nemocní s nepříznivými cytogenetickými aberacemi v porovnání s prognosticky příznivými (medián 7,17 vs. 1,83 pg/ml; $p = 0,0014$) (Graf 9). Expres ZAP-70 ani exprese CD38 s koncentrací TNF- α významně nekorelovaly ($p = 0,35$, resp. $p = 0,44$).

Graf 8. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s nemutovanými IgVH geny. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

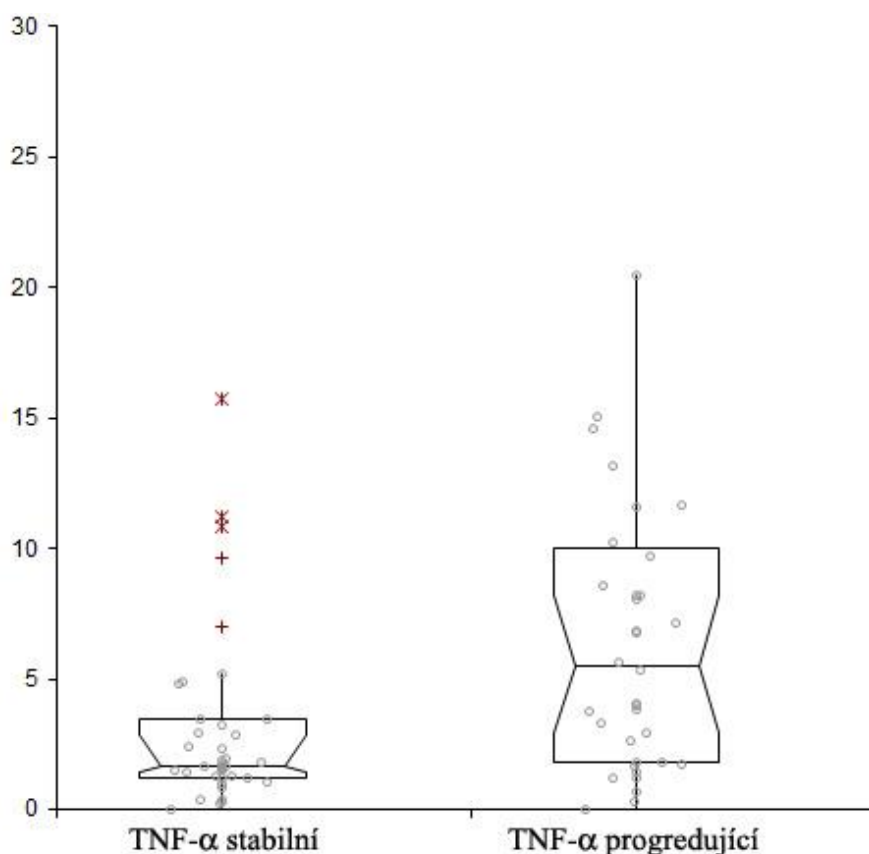


Graf 9. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s nepříznivými cytogenetickými aberacemi. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

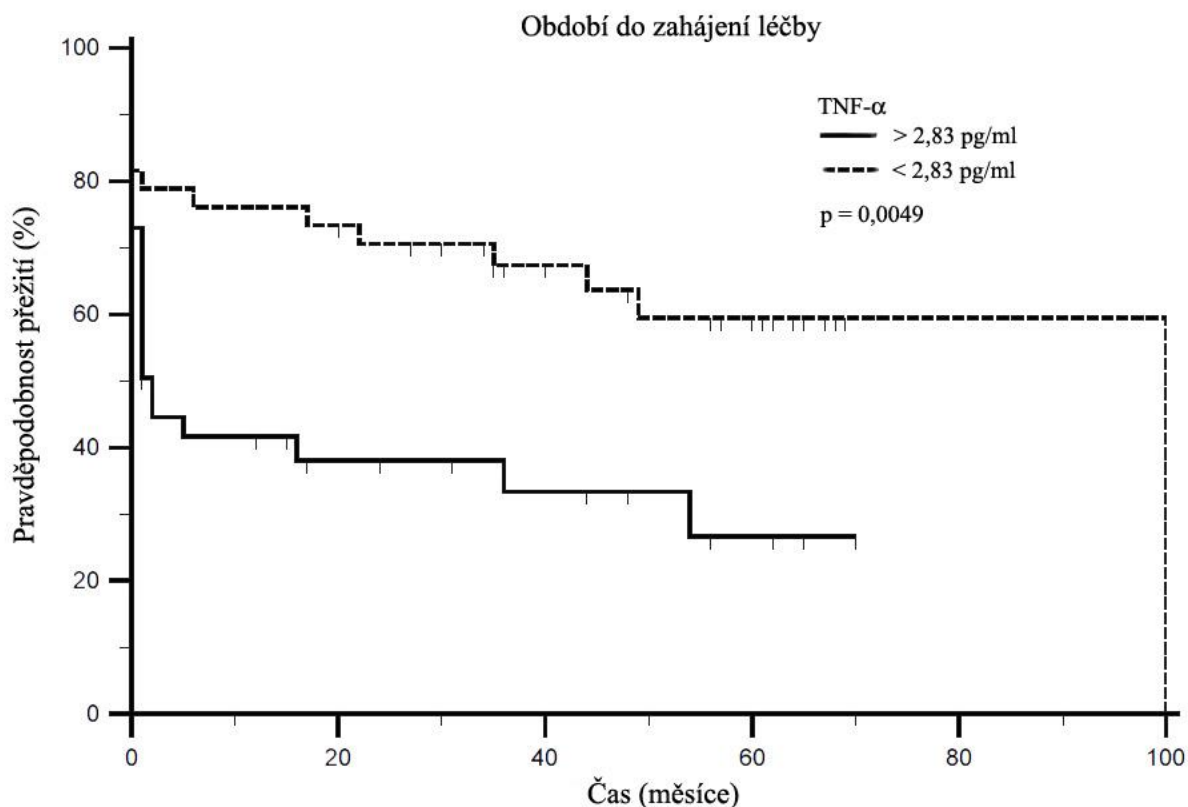


Nemocní, kteří v průběhu onemocnění progredovali (n = 36), měli významně vyšší hodnoty TNF- α než nemocní se stabilním onemocněním (medián 5,48 vs. 1,68 pg/ml; p = 0,0009) (Graf 10). Pacienti s koncentracemi TNF- α vyššími než medián (n = 37) měli významně kratší období do zahájení léčby než nemocní s nižšími koncentracemi (n = 38) (medián 2 vs. 100 měsíců; p = 0,0049) (Graf 11). Mezi těmito dvěma skupinami nebyl významný rozdíl v celkovém přežití (p = 0,085).

Graf 10. Nemocní s progresí CLL mají statisticky významně vyšší sérové koncentrace TNF- α než nemocní se stabilním onemocněním. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 11. Období do zahájení léčby je významně kratší u nemocných se sérovými koncentracemi TNF- α vyššími než medián (2,83 pg/ml).



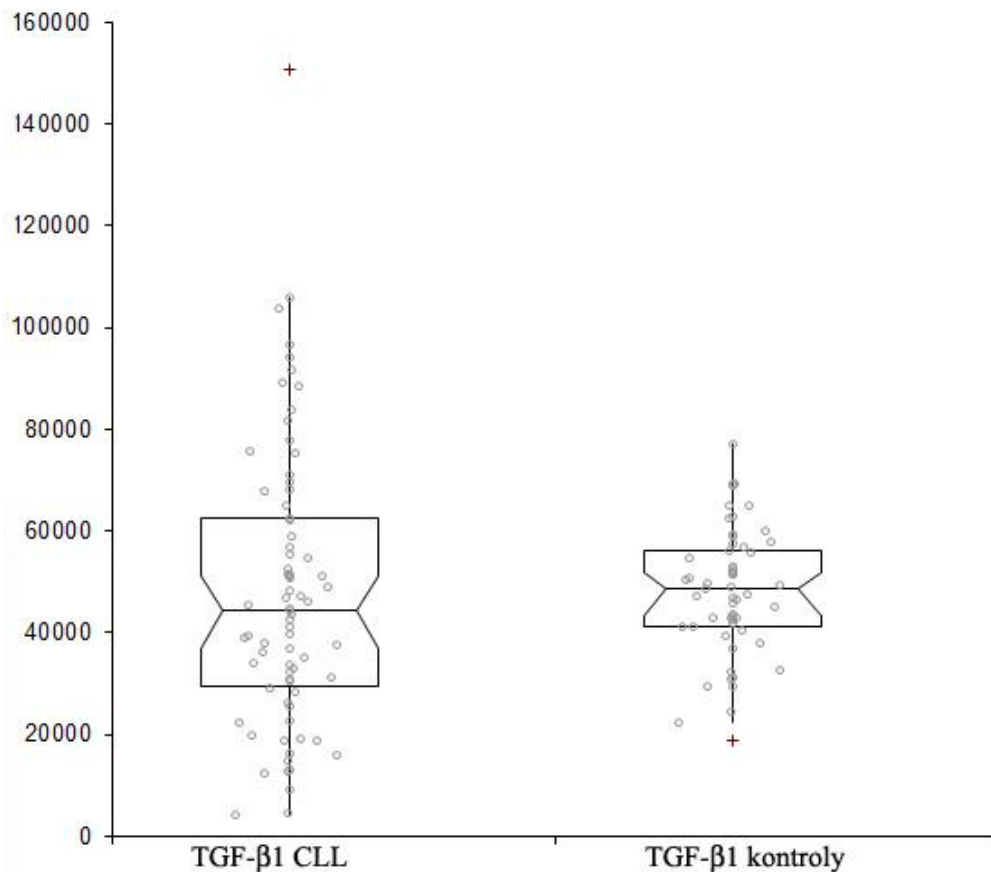
7.2 Hodnocení sérových koncentrací TGF- β 1 a exprese receptoru typu II pro TGF- β a jejich souvislost s prognostickými faktory a klinickým průběhem CLL

7.2.1 Hodnocení sérových koncentrací TGF- β 1

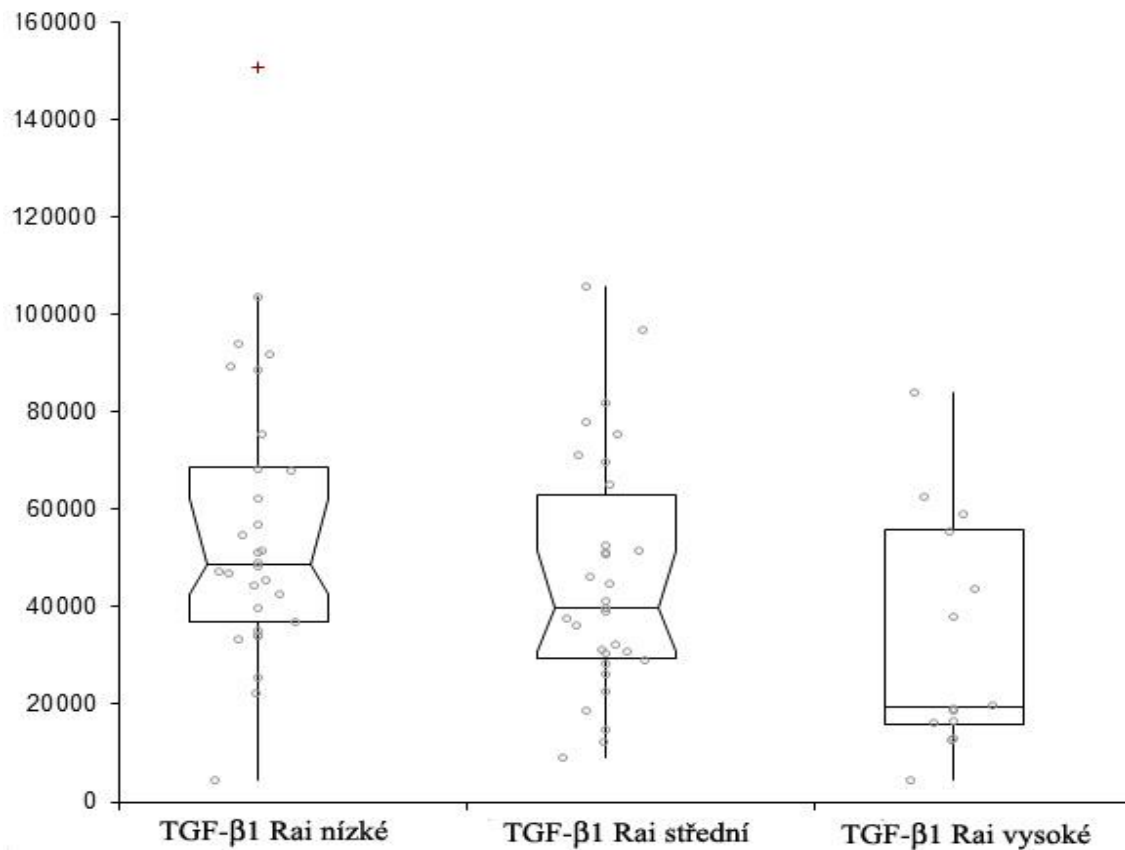
Sérový TGF- β 1 byl detekovatelný ve všech vzorcích. Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi TGF- β 1 u pacientů s CLL (medián 44280 pg/ml; průměrná sérová koncentrace 47734 pg/ml) a kontrolní skupinou (medián 48700 pg/ml; průměrná sérová koncentrace 48068 pg/ml) ($p = 0,26$) (Graf 12). Mezi muži a ženami nebyly koncentrace TGF- β 1 významně rozdílné ($p = 0,088$). Nemocní ve skupině s nízkým rizikem

dle Raie měli významně vyšší hladiny TGF- β 1 v porovnání se skupinou s vysokým rizikem dle Raie (medián 48735 vs. 19450 pg/ml; $p = 0,011$), nebyl ale rozdíl mezi skupinou nemocných s nízkým a středním rizikem ($p = 0,11$) a skupinou se středním a vysokým rizikem dle Raie ($p = 0,10$) (Graf 13). Koncentrace TGF- β 1 slabě negativně korelovala s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi ($p = 0,0037$; $r = - 0,33$) (Graf 14).

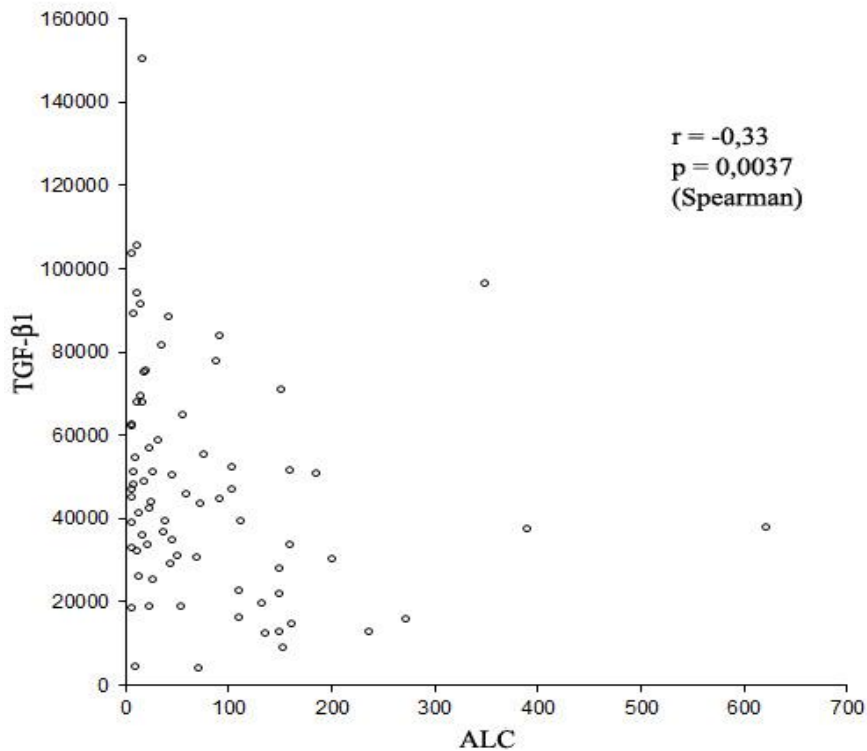
Graf 12. Sérové koncentrace TGF- β 1 nejsou významně rozdílné u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 13. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných s nízkým rizikem dle Raie v porovnání s vysokým rizikem. Sérové koncentrace TGF- β 1 se neliší mezi skupinami s nízkým a středním rizikem ani mezi skupinami se středním a vysokým rizikem dle Raie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

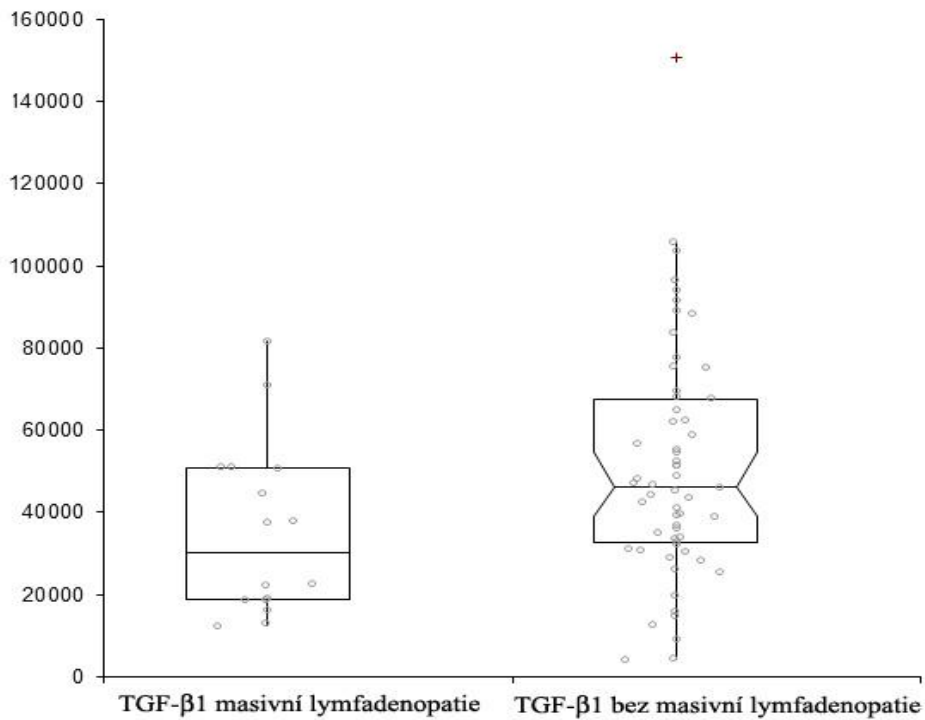


Graf 14. Sérové koncentrace TGF- β 1 slabě negativně korelují s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi (ALC). Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

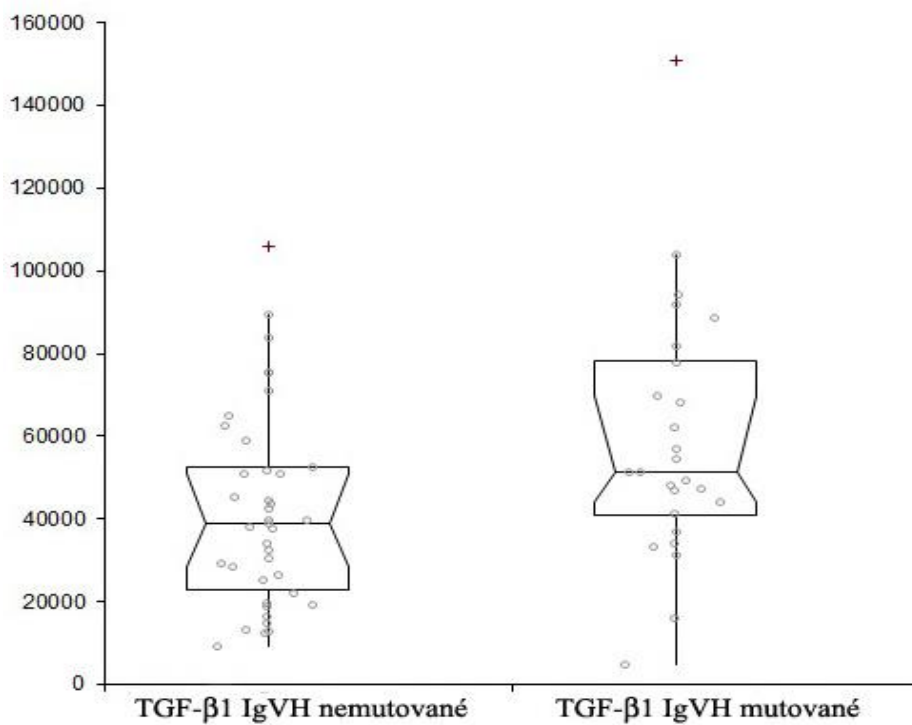


Významně vyšší sérové koncentrace TGF- β 1 byly nalezeny u pacientů bez masivní lymfadenopatie v porovnání s nemocnými s masivní lymfadenopatií (medián 46170 vs. 30116 pg/ml; $p = 0,0410$) (Graf 15). Nebyl zaznamenán rozdíl v koncentracích TGF- β 1 u nemocných se zvýšeným LDH ($p = 0,35$) a B2M ($p = 0,36$), ani u nemocných s nepříznivými cytogenetickými aberacemi ($p = 0,081$) či expresí CD38 ($p = 0,091$). Statisticky významně vyšší sérové koncentrace TGF- β 1 měli pacienti s mutovanými IgVH geny v porovnání s nemutovanými (medián 51350 vs. 39100 pg/ml; $p = 0,012$) (Graf 16) a pacienti ZAP-70 negativní (vs. ZAP-70 pozitivní) (medián 47115 vs. 33960 pg/ml; $p = 0,044$) (Graf 17).

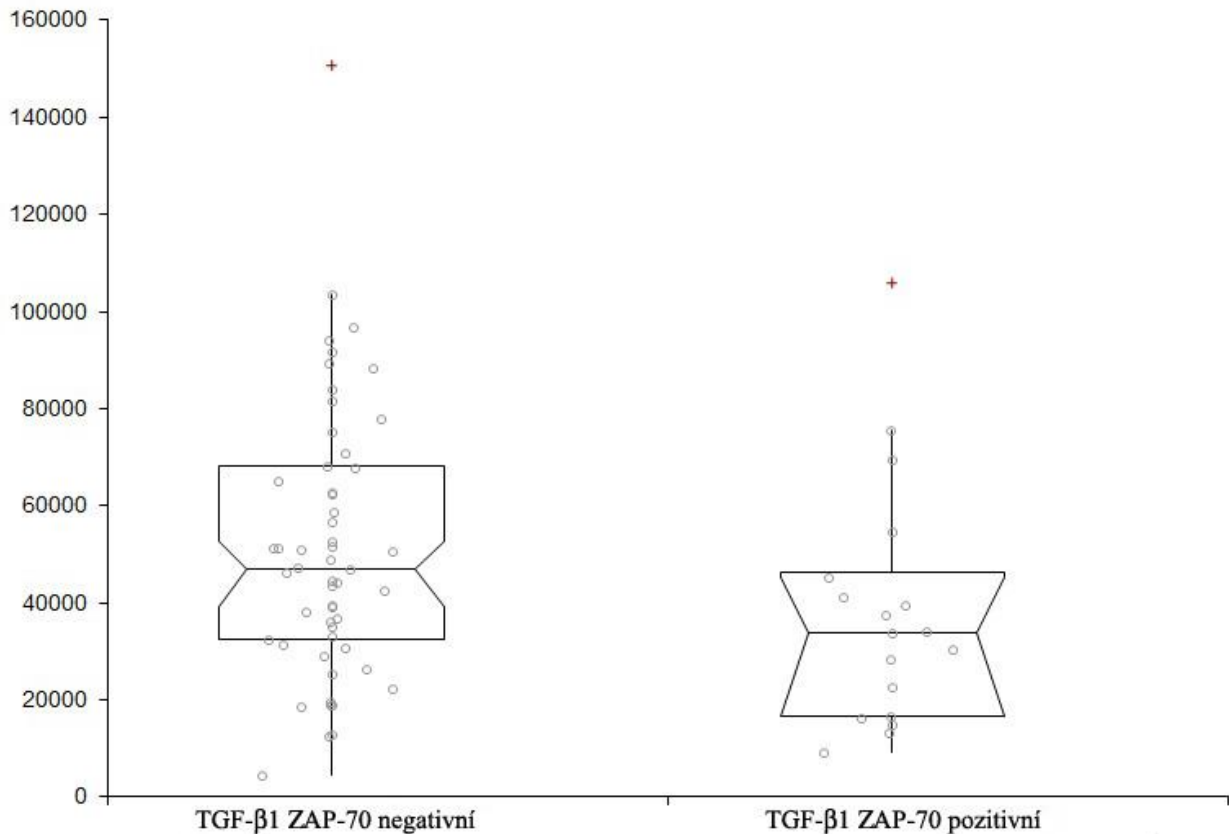
Graf 15. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných bez masivní lymfadenopatie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 16. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných s mutovanými IgVH geny. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

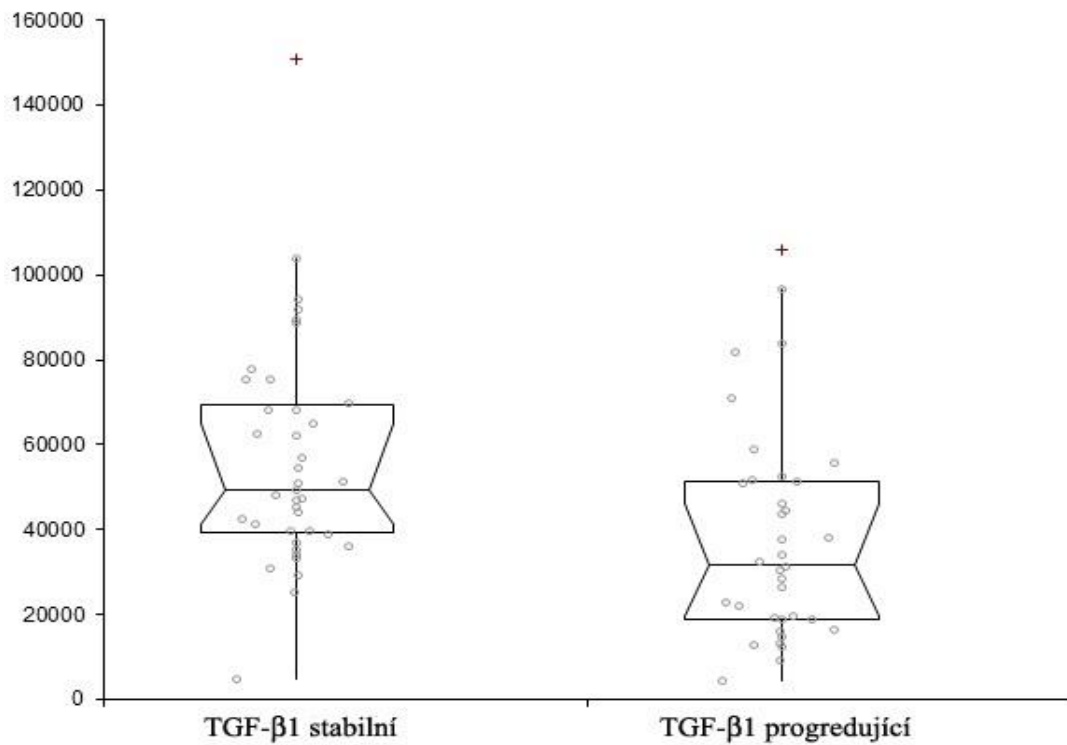


Graf 17. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných se ZAP-70 negativitou. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

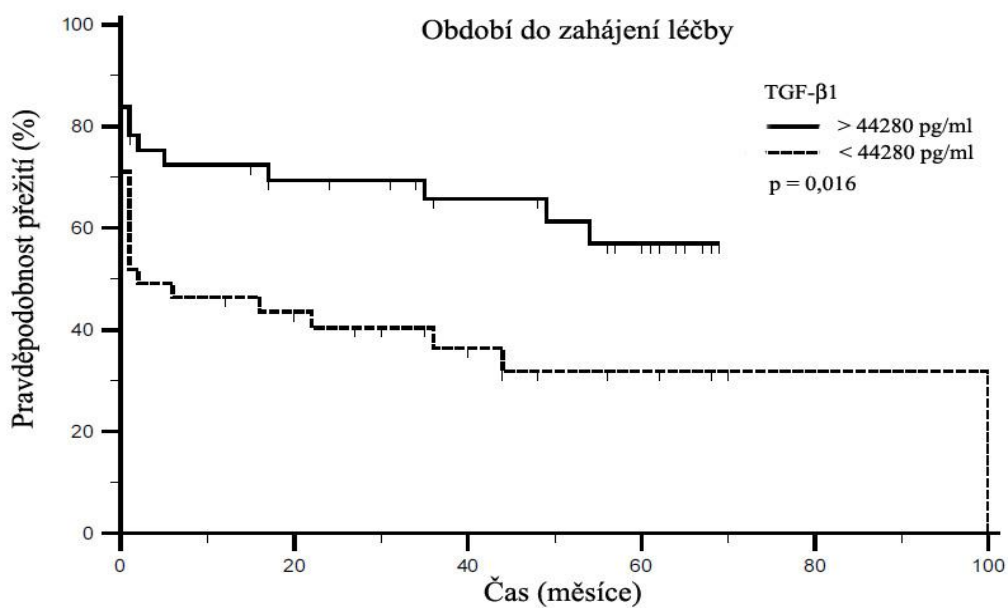


S hladinou TGF- β 1 velmi významně souvisel klinický průběh onemocnění – nemocní s progredující chorobou měli významně nižší koncentrace TGF- β 1 než nemocní se stabilním onemocněním (medián 31860 vs. 49140 pg/ml; $p = 0,0014$) (Graf 18). Období do zahájení léčby bylo významně delší u pacientů, kteří měli koncentrace TGF- β 1 vyšší než medián ($n = 37$) v porovnání s nemocnými s koncentracemi TGF- β 1 nižšími ($n = 38$) (medián nedosažen vs. medián 2 měsíce; $p = 0,016$) (Graf 19). V celkovém přežití nebyl mezi těmito dvěma skupinami rozdíl ($p = 0,44$). Nebyla nalezena korelace exprese TGF- β 1 a TNF- α ($p = 0,059$; $r = -0,22$).

Graf 18. Nemocní s progresí CLL mají statisticky významně nižší sérové koncentrace TGF- β 1 než nemocní se stabilním onemocněním. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



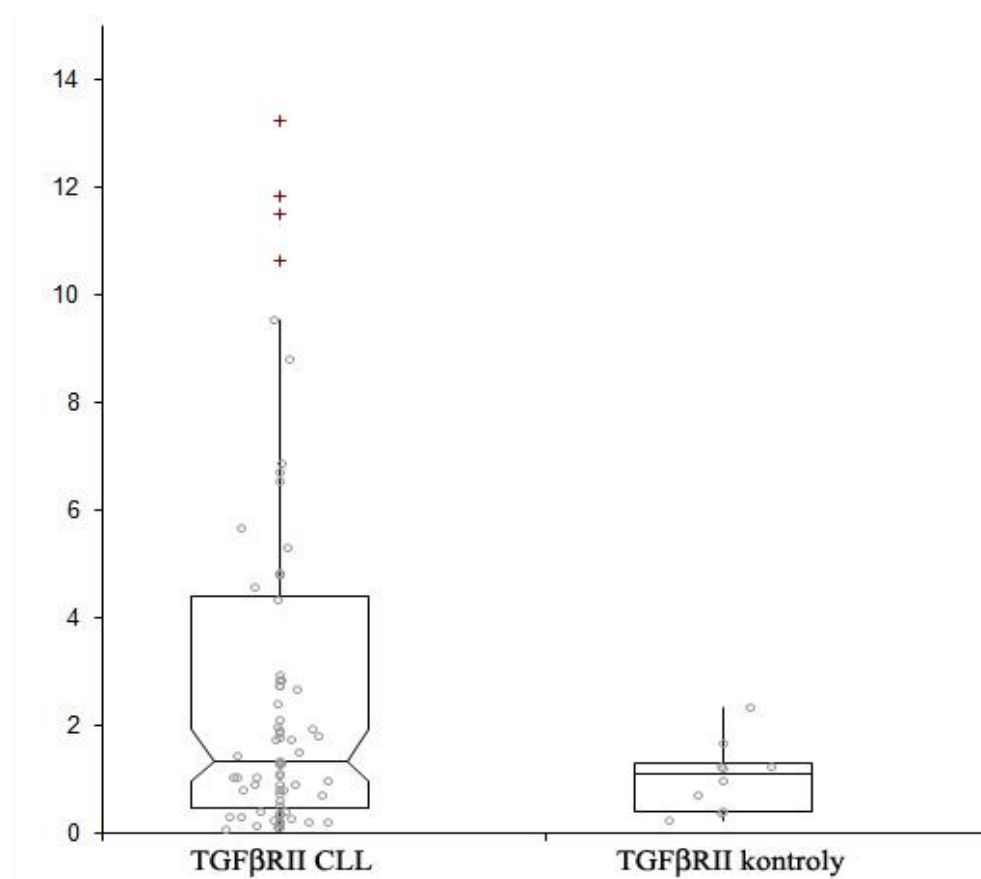
Graf 19. Období do zahájení léčby je významně delší u nemocných se sérovými koncentracemi TGF- β 1 vyššími než medián (44280 pg/ml).



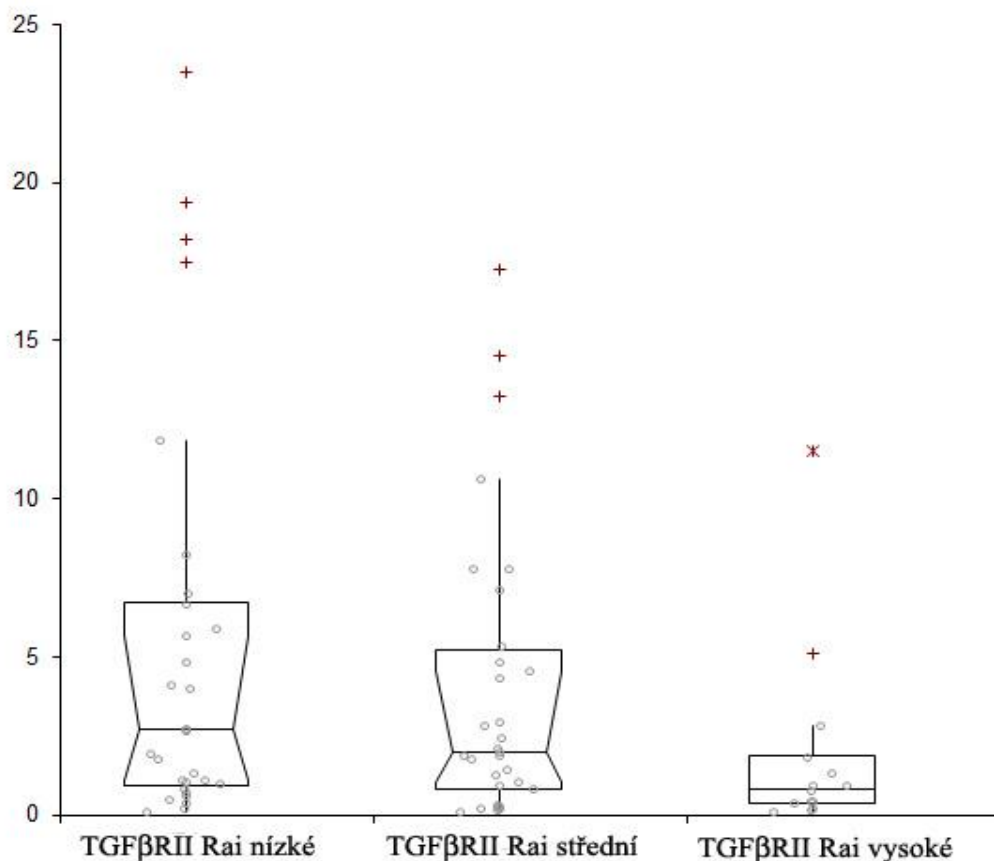
7.2.2 Hodnocení exprese TGFβRII

Expres TGFβRII byla měřitelná ve všech vzorcích, nemocní s CLL neměli v porovnání s kontrolami významně rozdílnou expresi TGFβRII (medián 1,32 vs. 1,09; $p = 0,22$) (Graf 20). Statisticky významně nižší expres TGFβRII byla zaznamenána u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým rizikem (medián 0,83 vs. 2,69; $p = 0,022$). Nebyl ale rozdíl v expresi TGFβRII mezi skupinou nemocných s nízkým a středním ($p = 0,53$) a středním a vysokým rizikem dle Raie ($p = 0,076$) (Graf 21).

Graf 20. Expres TGFβRII není významně rozdílná u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou. Expres je uvedena v procentech (%).



Graf 21. Statisticky významně nižší exprese TGFβRII u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým rizikem. Exprese TGFβRII se neliší mezi skupinami s nízkým a středním rizikem ani mezi skupinami se středním a vysokým rizikem dle Raie. Exprese je uvedena v procentech (%).



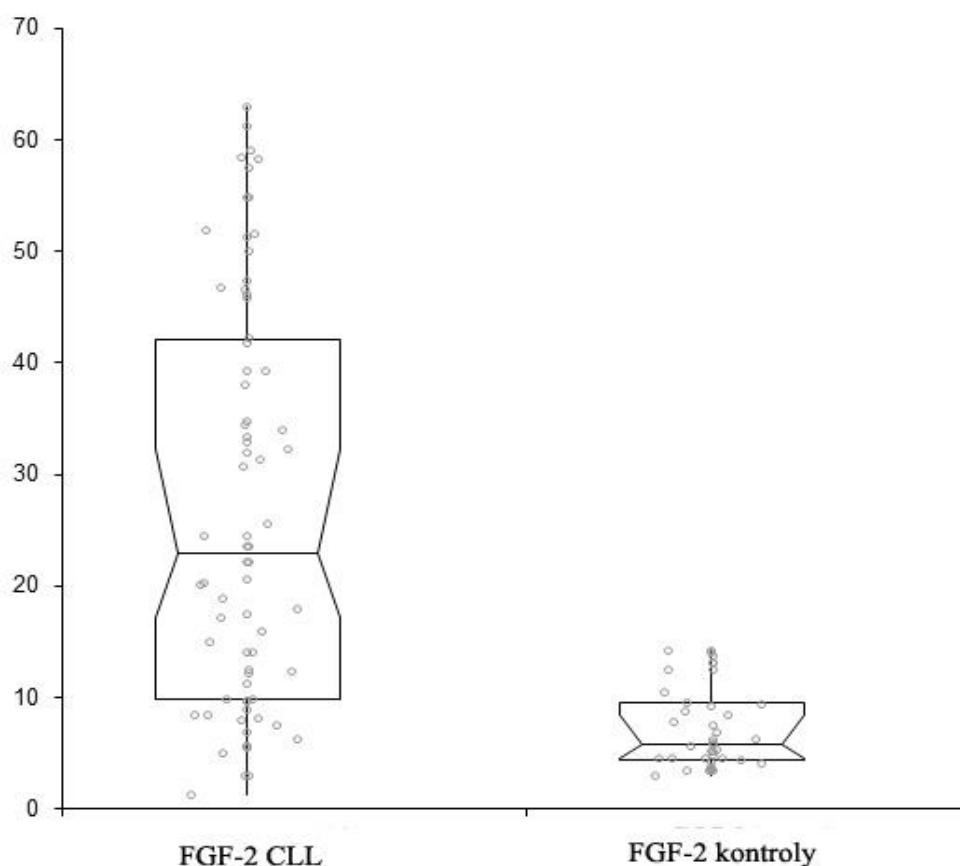
Exprese TGFβRII nebyla rozdílná v závislosti na pohlaví ($p = 0,17$) a na laboratorních ukazatelích jako je LDH a B2M ($p = 0,11$, resp. $0,78$), ani mutačním stavu, cytogenetických aberací ($p = 0,97$, resp. $p = 0,29$) a expresi ZAP-70 a CD38 ($p = 0,39$, resp. $p = 0,94$), či přítomnosti masivní lymfadenopatie ($p = 0,31$). Nebyl rozdíl v expresi TGFβRII mezi nemocnými se stabilní a progredující chorobou ($p = 0,29$). Období do zahájení léčby ani celkové přežití nebylo významně rozdílné u pacientů, kteří měli expresi TGFβRII vyšší než medián ($n = 37$) v porovnání s nemocnými s expresí TGFβRII nižší než medián ($n = 38$) ($p = 0,46$, resp. $p = 0,81$). Nebyla nalezena souvislost mezi expresí TGFβRII a koncentrací TGF-β1 ($p = 0,69$, $r = -0,05$) ani absolutním počtem lymfocytů ($p = 0,79$; $r = -0,03$).

7.3 Hodnocení sérových koncentrací FGF-2 a exprese receptoru typu 2 pro FGF-2 a jejich souvislost s prognostickými faktory a klinickým průběhem CLL

7.3.1 Hodnocení sérových koncentrací FGF-2

Sérový FGF-2 byl vyšetřen u 72/75 nemocných (96 %) a byl měřitelný ve všech vzorcích. Koncentrace FGF-2 byly statisticky významně vyšší u pacientů s CLL (medián 22,85 pg/ml; průměrná sérová koncentrace 26,9 pg/ml) oproti kontrolní skupině (medián 5,85 pg/ml; průměrná sérová koncentrace 7,27 pg/ml) [$p < 0,0001$] (Graf 22).

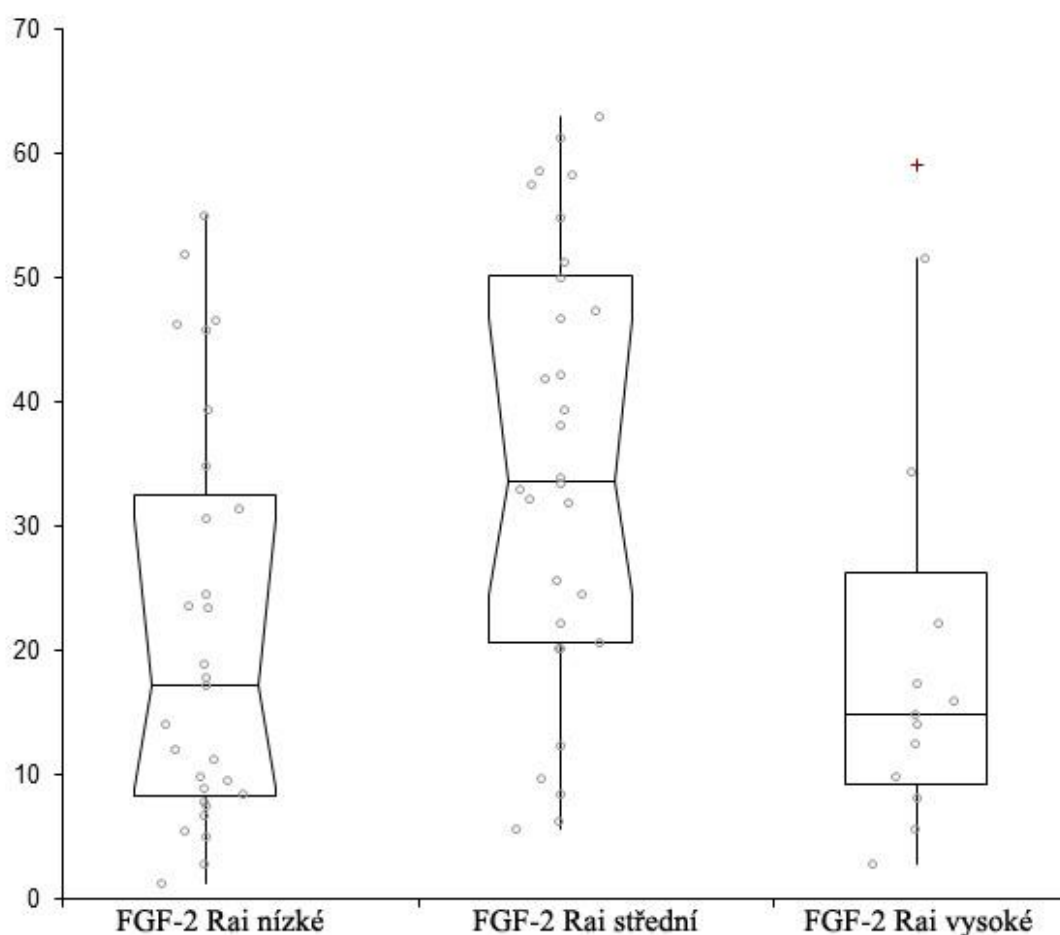
Graf 22. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací FGF-2 u nemocných s CLL v porovnání s kontrolami. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



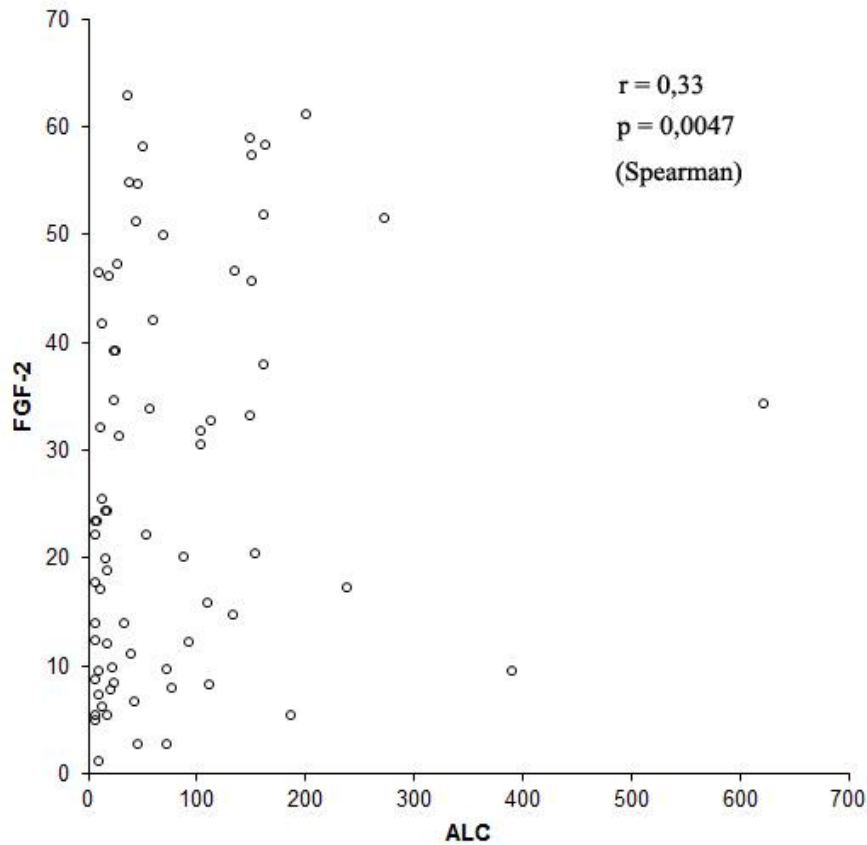
Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v koncentracích FGF-2 a mezi muži a ženami ($p = 0,44$). Nemocní se středním rizikem dle Raie měli významně vyšší koncentrace FGF-2 než nemocní s nízkým rizikem (medián 33,65 vs. 17,2 pg/ml; $p = 0,003$) i než nemocní s vysokým rizikem dle Raie (medián 33,65 vs. 14,9 pg/ml; $p = 0,021$). Mezi nemocnými

s nízkým a vysokým rizikem nebyl v koncentracích FGF-2 rozdíl ($p = 0,97$) (Graf 23). Nebyl zaznamenán rozdíl v koncentracích FGF-2 mezi skupinami s rozdílnou koncentrací LDH ($p = 0,98$) a B2M ($p = 0,58$). S koncentrací FGF-2 pozitivně koreloval absolutní počet lymfocytů ($p = 0,0047$; $r = 0,33$) (Graf 24).

Graf 23. Nemocní se středním rizikem dle Raie mají statisticky významně vyšší sérové koncentrace FGF-2 než nemocní s nízkým i vysokým rizikem. Sérové koncentrace FGF-2 se neliší mezi skupinou s nízkým a vysokým rizikem dle Raie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 24. Sérové koncentrace FGF-2 pozitivně korelují s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi (ALC). Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

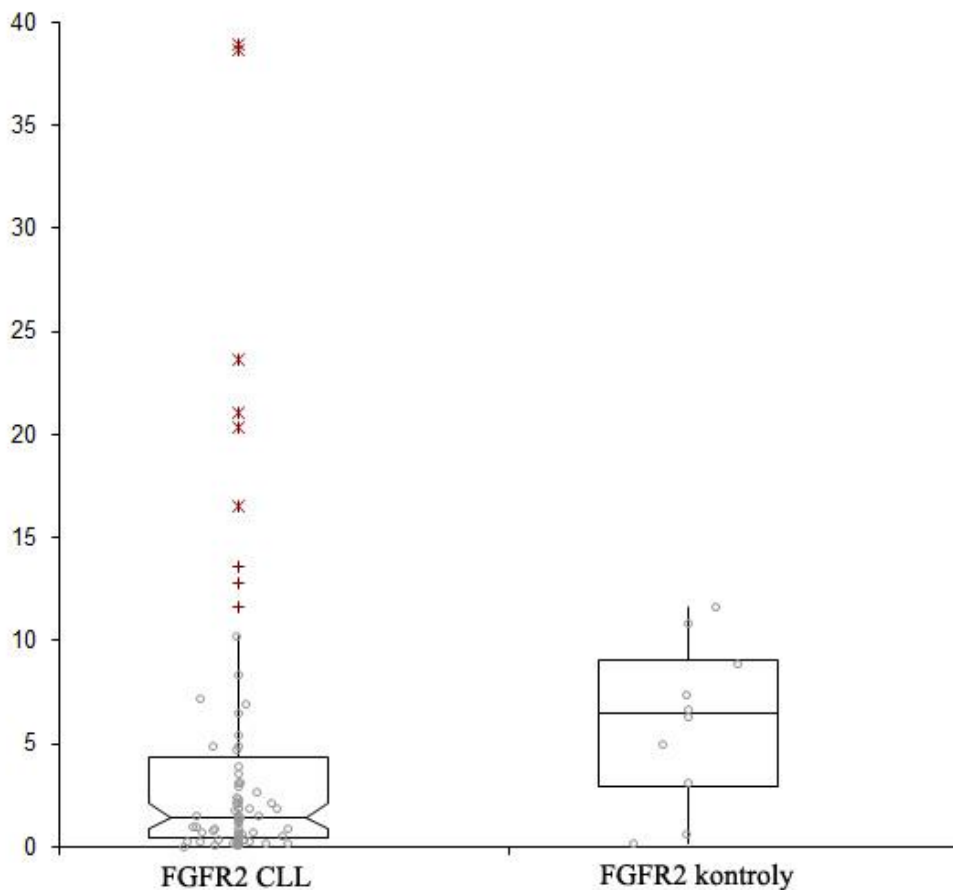


Nemocní s masivní lymfadenopatií neměli rozdílné koncentrace FGF-2 než nemocní bez bulku ($p = 0,14$). Nebyl také rozdíl mezi koncentracemi FGF-2 a IgVH mutačním stavem ($p = 0,79$), cytogenetickými aberacemi ($p = 0,5$), expresí ZAP-70 ($p = 0,97$) a expresí CD38 ($p = 0,37$). Koncentrace FGF-2 nebyly rozdílné mezi nemocnými se stabilní a progredující chorobou ($p = 0,18$). Období do zahájení léčby ani celkové přežití nebylo významně rozdílné u pacientů, kteří měli koncentrace FGF-2 vyšší než medián ($n = 36$) v porovnání s nemocnými s koncentracemi FGF-2 nižšími než medián ($n = 36$) ($p = 0,30$, resp. $p = 0,82$). Nebyla zaznamenána souvislost mezi koncentracemi FGF-2, TNF- α ($p = 0,22$) a TGF- β 1 ($p = 0,087$), ani s expresí TGF β R2 ($p = 0,97$) a FGFR2 ($p = 0,49$).

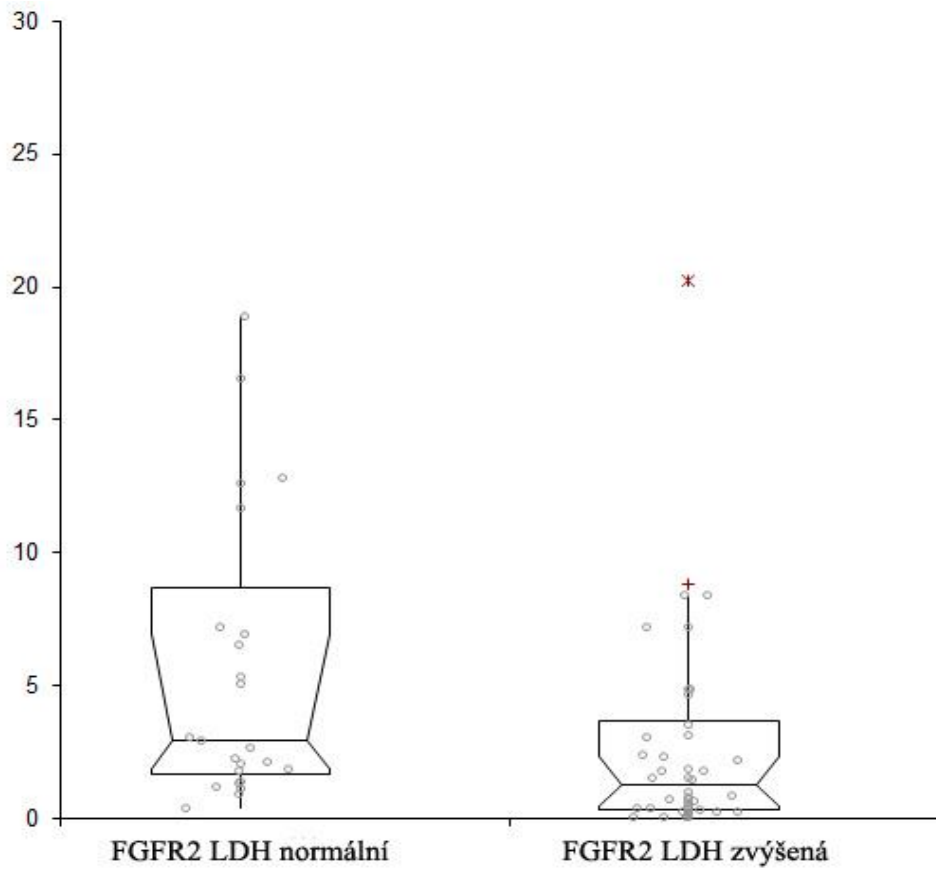
7.3.2 Hodnocení exprese FGFR2

Expres FGFR2 byla zjistitelná ve všech vyšetřovaných vzorcích. Byla zjištěna statisticky významně vyšší exprese FGFR2 v kontrolní skupině v porovnání s CLL pacienty (medián 6,48 vs. 1,46, $p = 0,042$) (Graf 25). Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v expresi FGFR2 mezi muži a ženami ($p = 0,35$) a mezi rizikovými skupinami dle Raie (nízké vs. střední riziko, $p = 0,77$; nízké vs. vysoké, $p = 0,12$; střední vs. vysoké riziko, $p = 0,11$). Nemocní s normálním LDH i B2M v séru měli statisticky významně vyšší expresi FGFR2 (medián 2,97; $p = 0,0032$, resp. medián 3,57; $p = 0,031$) (Graf 26 a Graf 27).

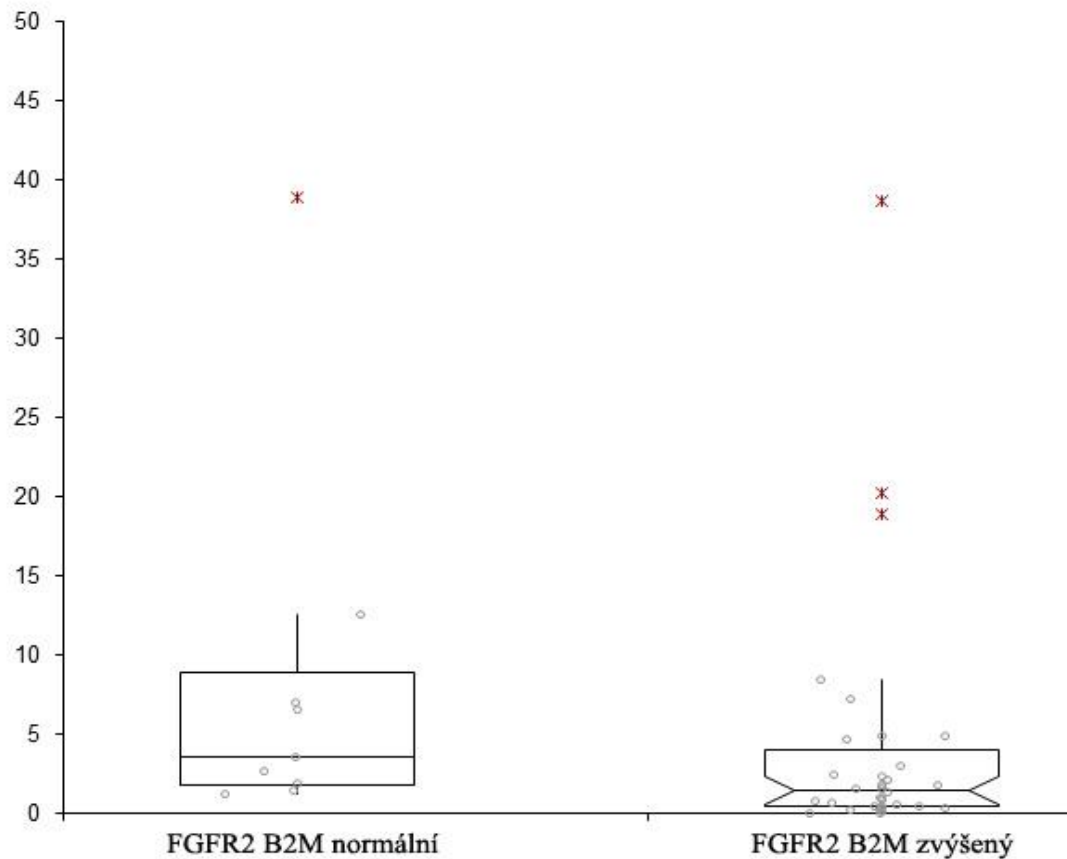
Graf 25. Expres FGFR2 je statisticky významně vyšší v kontrolní skupině v porovnání s nemocnými s CLL. Expres je uvedena v procentech (%).



Graf 26. Statisticky významně vyšší exprese FGFR2 u nemocných s normální sérovou LDH. Expresa je uvedena v procentech (%).

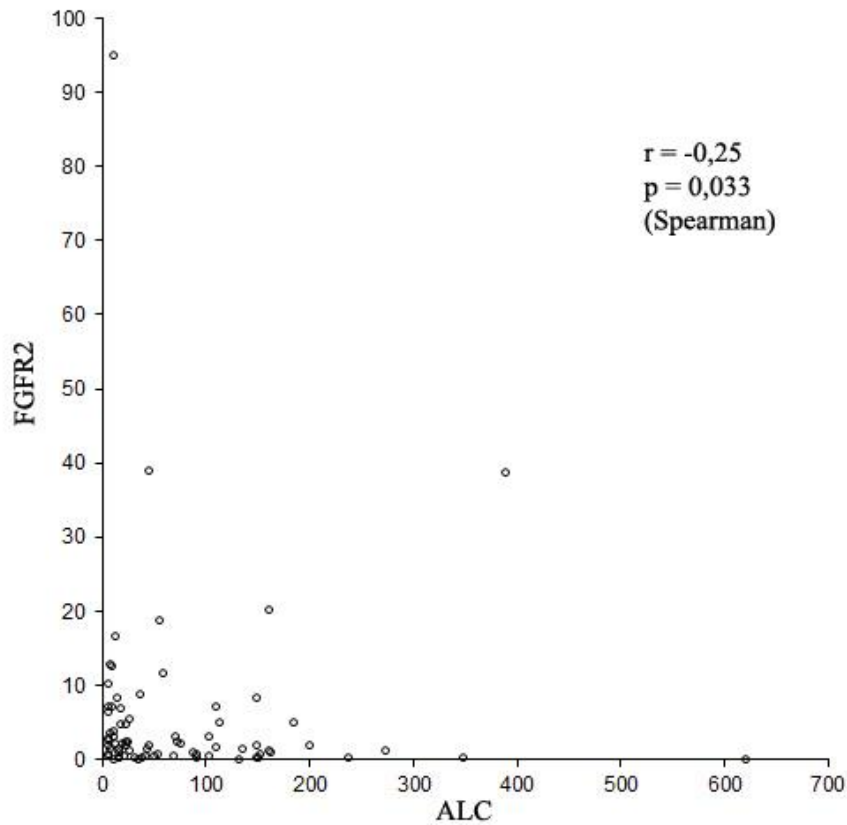


Graf 27. Statisticky významně vyšší exprese FGFR2 u nemocných s normálním sérovým B2M. Exprese je uvedena v procentech (%).



Nebyla nalezena souvislost mezi expresí FGFR2 a mutačním stavem a výskytem cytogenetických aberací ($p = 0,88$, resp. $p = 0,18$), ani expresí ZAP-70 a CD38 ($p = 0,12$, resp. $p = 0,89$), ani masivní lymfadenopatií ($p = 0,42$). S expresí FGFR2 slabě negativně koreloval absolutní počet lymfocytů ($p = 0,033$; $r = -0,25$) (Graf 28). Nebyl rozdíl v expresi FGFR2 mezi nemocnými se stabilní a progredující chorobou ($p = 0,15$). Období do zahájení léčby ani celkové přežití nebylo významně rozdílné u pacientů, kteří měli expresi FGFR2 vyšší než medián ($n = 36$) v porovnání s nemocnými s expresí FGFR2 nižší než medián ($n = 39$) ($p = 0,27$; resp. $p = 0,11$).

Graf 28. Exprese FGFR2 slabě negativně koreluje s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi (ALC). Exprese je uvedena v procentech (%).



Při provedení **multivariantní analýzy pro celkové přežití** byly identifikovány jako statisticky významné a nezávislé dva prognostické faktory, a to sérová koncentrace TNF- α a masivní lymfadenopatie ($p = 0,036$, resp. $p = 0,047$).

Tab. 7. Přehled nejdůležitějších nálezů v našem souboru – deskriptivní statistika.

Vyšetřované kazatele	n	Medián	Průměr	s	95 % IS průměru	p
TNF-α CLL	75	2,83	5,79	9,65	1,75-4,0	<0.0001
TNF- α kontroly	57	1,37	1,32	0,52	1,31-1,42	
TNF- α Rai nízké	30	1,69	3,32	3,94	1,42-2,97	p = 0,0008
TNF- α Rai vysoké	14	7,52	12,78	18,14	3,3-15,03	
TNF- α Rai střední	31	2,83	5,02	6,54	1,67-5,22	p = 0,0097
TNF- α Rai vysoké	14	7,52	12,78	18,14	3,3-15,03	
TNF- α B2M zvýšený	36	3,7	8,21	13,04	1,95-8,07	p = 0,045
TNF- α B2M normální	9	1,54	3,33	4,83	1,09-4,88	
TNF- α masivní lymfadenopatie	16	7,00	8,68	8,37	3,3-13,15	p = 0,0083
TNF- α bez masivní lymfadenopatie	59	1,88	5,00	9,89	1,62-3,20	
TNF- α IgVH nemutované	39	4,88	5,96	5,12	4,28-7,64	p = 0,041
TNF- α IgVH mutované	26	1,86	5,23	14,01	0,43-10,89	
TNF- α cytogenetika nepříznivá	21	7,17	8,82	8,06	5,15-12,49	p = 0,0014
TNF- α cytogenetika příznivá	47	1,83	3,26	3,39	2,27-4,26	
TNF- α progredující	36	5,48	8,75	12,92	2,97-8,17	p = 0,0009
TNF- α stabilní	39	1,68	3,05	3,424	1,42-2,83	
TGF-β1 Rai nízké	30	48735	56510	29280	42660-62300	p = 0,011
TGF- β 1 Rai vysoké	14	19450	33101	24084,7	13119,3-58900	
TGF- β 1 masivní lymfadenopatie	16	30116	35625	21261,4	18765-51030	p = 0,041
TGF- β 1 bez masivní lymfadenopatie	59	46170	51018	28134,5	39100-54600	

TGF-β1 IgVH nemutované	39	39100	41771	23488,1	28350-50760	p = 0,012
TGF-β1 IgVH mutované	26	51350	59100	30439,1	44280-69660	
TGF-β1 ZAP-70 negativní	54	47115	51535	27689,9	39100- 52650	p = 0,044
TGF-β1 ZAP-70 pozitivní	18	33960	38272	25089,6	16510,5-45360	
TGF-β1 progredující	36	31860	38177	25313,5	19793,7-46170	p = 0,0014
TGF-β1 stabilní	39	49140	56556	26617,5	41310-65070	
TGFβRII Rai nízké	30	2,69	5,24	6,43	1,08-5,68	p = 0,022
TGFβRII Rai vysoké	14	0,83	1,91	3,08	0,21-2,84	
FGF-2 CLL	72	22,85	26,9	18,11	17,2-32,2	<0.0001
FGF-2 kontroly	40	5,85	7,27	3,66	4,5-8,5	
FGF-2 Rai nízké	30	17,2	21,32	16,18	8,9-30,7	p = 0,003
FGF-2 Rai střední	31	33,65	35,0	17,57	24,5-46,7	
FGF-2 Rai vysoké	14	14,9	20,65	17,37	8,1-34,4	p = 0,021
FGF-2 Rai střední	31	33,65	35,0	17,57	24,5-46,7	
FGFR2 CLL	75	1,46	5,45	12,9	0,86-2,12	p = 0,042
FGFR2 kontroly	10	6,48	6,06	3,92	0,61-10,86	
FGFR2 B2M zvýšený	36	1,42	6,39	9,45	0,60-2,32	p = 0,031
FGFR2 B2M normální	9	3,57	8,42	5,98	1,4-12,6	
FGFR2 LDH zvýšená	46	1,25	5,32	14,98	0,5-2,32	p = 0,0032
FGFR2 LDH normální	25	2,97	6,72	8,49	1,9-6,96	

Sérové koncentrace TNF-α, TGF-β1 a FGF-2 jsou v pg/ml.

Expresse TGFβRII a FGFR2 jsou v %.

s - standardní odchylka, *IS* - interval spolehlivosti

8. Diskuze

Stanovení a zpřesnění prognózy u pacientů s CLL je v několika posledních letech věnována velká pozornost. Díky některým novým prognostickým ukazatelům (zejména IgVH mutační stav, cytogenetické aberace, ZAP-70, CD38) je možné již v době stanovení diagnózy rozdělit nemocné do skupin významně se lišících prognózou, a předpovědět tak klinický průběh onemocnění. Hledání nových faktorů však stále pokračuje, neboť díky dalšímu zpřesnění individuální prognózy se do budoucna nabízí i možnost načasování a přizpůsobení intenzity léčby individuálnímu riziku nemocného (2, 3, 5, 30). Prognostické faktory také vypovídají mnohé o patogenezi choroby. Z cirkulujících cytokinů, které sehrávají důležitou roli v patogenezi, biologickém chování maligního klonu a jsou často zmiňovány v souvislosti s poruchou apoptických drah, proliferací a angiogenezí u CLL, jsme ověřovali prognostický význam TNF- α , TGF- β 1, TGF β RII, FGF-2 a FGFR2. Právě na příkladu těchto cytokinů je také velmi dobře patrné, že se jednotlivé signální dráhy zapojené do apoptických, proliferčních a angiogenních pochodů u CLL vzájemně velmi těsně prolínají.

8.1 Prognostický význam sérových koncentrací TNF- α

TNF- α je cytokin působící anti-apopticky a jako autokrinní růstový faktor pro maligní CLL lymfocyty (6, 29, 35, 201). Zvýšené sérové/plazmatické koncentrace TNF- α byly u nemocných s CLL opakovaně prokázány a ve většině prací jsou spojovány s méně příznivou prognózou CLL (6, 185, 196, 197, 198, 199, 200, 204). Stěžejní práce zabývající se prognostickou hodnotou TNF- α byly publikovány poměrně nedávno. Ferrajoli et al. na souboru léčených i neléčených nemocných s CLL prokázali, že významně vyšší hladiny TNF- α v plazmě měli nemocní v pokročilém stádiu (Rai III-IV), s vyšším počtem leukocytů v PK, s vyšší hodnotou B2M, pozitivitou CD38, nepříznivými cytogenetickými aberacemi (del 11q, del 17p13, trisomií 12) a se závažnějším stupněm anémie a trombocytopenie. Tyto nálezy byly významné i pro skupinu neléčených nemocných. Zvýšené koncentrace TNF- α byly spojeny s významně kratším OS a byly nezávislým faktorem pro OS, a to včetně skupiny neléčených pacientů a nemocných v časnějších stádiích (Rai 0-II) (6). Jako první prokázali souvislost zvýšených plazmatických koncentrací TNF- α se ZAP-70 pozitivitou Bojarska-Junak et al. V jejich práci byly zvýšené koncentrace TNF- α u neléčených nemocných dále spojeny s pokročilými stádii, vyšším ALC, počtem leukocytů v PK i B2M, pozitivitou CD38, závažnějším stupněm anémie a kratším TTT i OS. Vliv vyšších koncentrací TNF- α na OS se

však stíral u skupiny nemocných se současnou ZAP-70 i CD38 negativitou v porovnání s pozitivitou obou znaků. U nemocných v remisi po léčbě došlo k významnému poklesu TNF- α v porovnání s nemocnými na léčbu refrakterními (204). Negativní vliv vyšších koncentrací TNF- α na OS potvrdila i práce Singera et al. (205). Koexprese vyšších sérových koncentrací TNF- α a IL-10 korelovala ve studii Lech-Marandové et al. s vyšším počtem leukocytů v PK i B2M, ZAP-70 a CD38 pozitivitou, pokročilými stádii, závažnějším stupněm anémie a trombocytopenie a kratším obdobím bez nutnosti léčby (treatment-free survival, TFS) i OS. Vysoká koexprese TNF- α a IL-10 byla nezávislým faktorem pro TFS, a to i u stádií 0-II dle Raije a bez ohledu na mutační stav. Nezávislým faktorem byla i pro OS, tento význam se ale stíral u skupiny Rai 0-II a u nemocných s mutovanými IgVH geny (206). Z prognostického hlediska patří TNF- α z námi hodnocených ukazatelů u CLL k nejprobádanějším. I v našem souboru byly sérové koncentrace TNF- α u CLL nemocných významně vyšší v porovnání s koncentracemi TNF- α u zdravých dobrovolníků. V souladu s literárními údaji potvrzují naše výsledky úlohu TNF- α jako významného negativního prognostického ukazatele u CLL: významně vyšší sérové koncentrace TNF- α měli nemocní ve skupině s vysokým rizikem dle Raije v porovnání se skupinou s nízkým i středním rizikem, s nemutovanými IgVH geny a nepříznivými cytogenetickými aberacemi. Právě IgVH a cytogenetické nálezy jsou v současné době u CLL považovány za nejdůležitější prognostické faktory ve vztahu k celkovému přežití (2). Významně vyšší koncentrace TNF- α byly také zjištěny u nemocných s vyšší hodnotou sérového B2M, který je u CLL spojován s pokročilým klinickým stavem, objemnou lymfadenopatií, významnou infiltrací kostní dřeně, pozitivitou ZAP-70 a CD38 (3, 64). V několika studiích byl B2M nezávislým faktorem predikujícím celkové přežití (57, 62, 63). Významně vyšší koncentrace TNF- α byly zaznamenány i u nemocných s masivní lymfadenopatií. Na rozdíl od literárních dat jsme neprokázali souvislost mezi TNF- α a expresí CD38 a ZAP-70. S koncentrací TNF- α pozitivně koreloval absolutní počet lymfocytů, šlo však o slabou korelaci ($r = 0,27$), z čehož vyplývá, že hodnota TNF- α není lineárním ukazatelem velikosti nádorové masy. Výše koncentrace TNF- α v našem souboru významně souvisela s klinickým průběhem onemocnění - nemocní s progresí CLL měli významně vyšší hodnoty TNF- α než nemocní se stabilním onemocněním. Také TTT bylo významně kratší u pacientů s vyšším TNF- α .

8.2 Prognostický význam sérových koncentrací TGF- β 1 a exprese TGF β RII

TGF- β je cytokin, který hraje v patogenezi CLL významnou roli (7, 211, 216). Buňky CLL jej vylučují a jeho zvýšené koncentrace v séru/plazmě lze u pacientů s CLL prokázat (8, 9, 122, 212, 213, 214, 215). Úlohu TGF- β v rozvoji CLL však není snadné jednoznačně definovat. TGF- β může působit svým anti-proliferačním a pro-apoptickým účinkem na maligní lymfocyty jako negativní regulátor nádorového procesu (7, 8, 9, 217). Má však také významné vlastnosti imunosupresivní, čímž přispívá k oslabení imunitního dozoru a účinky pro-angiogenní, a tyto oba mohou vést k progresi onemocnění a ke zhoršení prognózy (7, 9, 12, 140). Vliv na anti-proliferační působení TGF- β mají také změny exprese TGF β R na leukemických buňkách (7, 29, 211, 214, 218, 219). Kromě výše hladin TGF- β a statutu TGF- β receptorů ovlivňuje a znesnadňuje interpretaci významu TGF- β v patogenezi a prognóze CLL i fakt, že signální dráha TGF- β je regulována na několika úrovních počínaje vazbou ligandů na TGF β R přes regulaci v nitrobuněčné signalizaci až po regulaci transkripce příslušných genů na úrovni buněčného jádra (7). Dalším neopomenutelným a snad i zásadním problémem v hodnocení významu TGF- β coby prognostického ukazatele u CLL je skutečnost, že dosavadní práce hodnotily jeho prognostický význam pouze v souvislosti s klinickými stádii, chybí však systematické porovnání s ostatními ať už klasickými či zejména novými ukazateli a klinickým průběhem onemocnění. Navíc u téměř všech publikací jsou počty nemocných velmi omezené. Pouze v práci Romano et al. byla hodnocena souvislost s citlivostí na TGF- β (hodnocena byla schopnost vyvolat apoptózu po podání TGF- β) a zdvojovacím časem lymfocytů. Nemocní citliví na působení TGF- β měli významně delší LDT (více než 12 měsíců) než nemocní, u nichž podání TGF- β apoptózu nevyvolalo. To také podporuje roli TGF- β coby významného inhibitoru buněčného růstu. Primárně se však práce zabývala efektem podání imunosupresiva tacrolimu (FK506) na signální dráhu TGF- β u CLL a korelace s LDT byla „vedlejším nálezem“ analýzy (209). Friedenberga et al. nenalezli korelaci mezi TGF- β a ALC (a mimo jiné ani souvislost mezi koncentracemi TGF- β a expresí TGF β R, MDR1 mRNA (multidrug resistance) a rezistencí na léčbu (8). Také souvislost s klinickým průběhem zhodnotily pouze dvě publikace - Gora-Tybor et al. popsali významně vyšší hladiny TGF- β 1 u nemocných s progredující CLL a již citovaní Friedenberga et al. nenalezli při analýze hladin TGF- β s klinickým průběhem CLL signifikantní korelaci (8, 9). V rozporu s literárními daty jsme nepotvrdili zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných s CLL v porovnání s kontrolami, pravděpodobně v důsledku relativně omezeného rozsahu souboru. Při analýze jednotlivých podskupin a zcela v souladu s dosud

publikovanými pracemi (8, 9, 217) měli i v našem souboru nemocní ve skupině s nízkým rizikem dle Raie významně vyšší hladiny TGF- β 1 v porovnání se skupinou s vysokým rizikem. Významně vyšší koncentrace TGF- β 1 byly také spojeny s výskytem dalších příznivých prognostických ukazatelů, jako jsou mutované IgVH geny a negativita ZAP-70 i příznivějším klinickým průběhem - vyšší hladiny měli pacienti se stabilním onemocněním a delším TTT. Také nemocní bez masivní lymfadenopatie měli významně vyšší TGF- β 1 než nemocní s bulkem. Dále koncentrace TGF- β 1 negativně korelovala s ALC. Nebyla nalezena korelace koncentrací TGF- β 1 a TNF- α . V našem souboru jsou tedy vyšší koncentrace TGF- β 1 jednoznačně příznivým prognostickým ukazatelem. Jak již bylo řečeno, kromě souvislosti TGF- β s klinickými stádii neexistuje u CLL žádná publikace, která by jej porovnávala s ostatními klasickými a novými ukazateli tak, jako je tomu v naší práci.

V našem souboru nekorelovala koncentrace TGF- β 1 s expresí receptoru TGF β RII. Genetické změny TGF β R1 i II vedoucí ke kvalitativním i kvantitativním změnám receptorů jsou u celé řady solidních nádorů (například prsu, vejcovodů, střeva či prostaty) spojovány s horší prognózou včetně kratšího přežití nemocných (140, 219). Defekty TGF β RII také zvyšují riziko rozvoje některých typů ne Hodgkinových lymfomů (zejména T-buněčné linie, například Sézaryho syndromu) či myeloproliferativních chorob (polycytemia vera, esenciální trombocytémie) (7, 140, 210). I u CLL bylo ověřeno, že snížení či ztráta exprese (spojené se sníženou mRNA pro TGF β R), nebo funkční defekty TGF β R se zachovalou expresí (s normální hladinou mRNA pro TGF β R) vedou k poklesu citlivosti vůči působení TGF- β . Na rozdíl od solidních nádorů se této problematice ale věnovalo jen omezené množství prací (8, 211, 218, 219). Schiemann et al. identifikovali dvě mutace genu kódujícího TGF β R1 u nemocných s prokázanou rezistencí na anti-proliferativní efekt TGF- β (219). Také DeCoteau popsal souvislost ztráty exprese TGF β R1 s odolností na anti-proliferativní vliv TGF- β (211).

V našem souboru nebyla exprese TGF β RII rozdílná u skupiny nemocných s CLL a kontrolní skupinou. Statisticky významně nižší exprese TGF β RII byla zaznamenána u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým rizikem. Nízká exprese TGF β RII by u nemocných v pokročilých klinických stádiích dle Raie mohla přispívat k rezistenci na anti-proliferativní působení TGF- β a horší prognóze. Práce Ho, DeCoteau ani Lagneaux et al. souvislost exprese receptorů pro TGF- β s klinickými stádii neprokázaly (211, 217, 218). Exprese TGF β RII v našem souboru kromě rizikových skupin dle Raie významně nekorelovala s žádným z dalších hodnocených prognostických ukazatelů ani s klinickým průběhem onemocnění. Důležitým aspektem znesnadňujícím interpretaci našich nálezů týkajících se exprese TGF β RII, stejně jako je tomu u koncentrací TGF- β 1, je fakt, že

hladiny TGF β R1 a TGF β R2 jsou také regulovány na několika úrovních - transkripčních i postranskripčních (140). Nezanedbatelný význam má také to, že necitlivost na TGF- β (zejména na jeho pro-apoptické působení) může být způsobena i kvalitativními, tedy strukturálními změnami receptorů, my jsme však v naší práci hodnotili pouze změny kvantitativní. Korelace exprese TGF β R2 s žádnými uznávanými prognostickými ukazateli u CLL (ať už klasickými či novými) nebyla dosud publikována..

8.3 Prognostický význam sérových koncentrací FGF-2 a exprese FGFR2

Fibroblastový růstový faktor-2 je důležitý angiogenní cytokin produkovaný maligními CLL lymfocyty, jehož zvýšené sérové/plazmatické (i intracelulární) koncentrace u CLL byly potvrzeny mnoha autory (9, 11, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 231). FGF-2 je růstovým faktorem pro endotelové buňky (ale také pro buňky hematopoetické, epiteliální či fibroblasty) a působí také jako inhibitor apoptózy leukemických CLL lymfocytů (28, 117, 131, 222, 224, 230, 232). I v našem souboru byly v souladu s publikovanými pracemi sérové koncentrace FGF-2 významně vyšší u nemocných s CLL v porovnání s kontrolami. Nemocní se středním rizikem dle Raie měli významně vyšší koncentrace FGF-2 než nemocní s nízkým rizikem, ale i než nemocní s vysokým rizikem dle Raie. Koncentrace FGF-2 pozitivně korelovala s ALC, který byl v několika studiích nezávislým negativním prognostickým faktorem se vztahem k OS i TTT první linie (57, 60, 61). Jiné významné souvislosti FGF-2 s ostatními klasickými ani novými ukazateli ani s klinickým průběhem nebyly prokázány. Nebyla zaznamenána souvislost mezi koncentracemi FGF-2, TNF- α a TGF- β 1, ani s expresí TGF β R2 a FGFR2.

Z hlediska prognostického významu FGF-2 se však výsledky mnohých studií také velmi rozcházejí (ať už při srovnání s klasickými, tak i s novými prognostickými ukazateli a klinickým průběhem CLL). Příčinou mohou být metodické nedostatky jako nedostatečný rozsah kontrolní skupiny, samotných nemocných, eventuálně i zařazení nemocných, kteří před hodnocením již podstoupili cytoredukční léčbu a v neposlední řadě i odlišný způsob stanovení koncentrací FGF-2 (plazma vs. sérum). Ve většině prací jsou vyšší sérové/plazmatické koncentrace spojeny spíše s nepříznivým průběhem CLL; byla také prokázána souvislost zvýšených hladin intracelulárního FGF-2 v CLL buňkách a pokročilým klinickým stádiem (9, 28, 120, 231). Přehled nejdůležitějších studií, u nichž byly u CLL prokázány zvýšené plazmatické/sérové koncentrace FGF-2 a jejich souvislost s prognostickými ukazateli, shrnuje Tabulka 7.

Duensing et al. popisují významně vyšší hladiny plazmatického FGF-2 u pokročilých stádií CLL a u nemocných s vyšším ALC (120). Také ve studii Gora-Tybor et al. byly vyšší sérové koncentrace spojeny s pokročilými stádii dle Raie, progresí choroby a pozitivně korelovaly s ALC (9). Korelaci mezi vyššími sérovými koncentracemi FGF-2 a počtem leukocytů v periferní krvi popsali také Bairey et al. (28). Molica et al. opakovaně prokázali signifikantně vyšší sérové koncentrace FGF-2 i u nemocných v časných stádiích CLL (A dle Bineta), nepodařilo se ale prokázat souvislost mezi FGF-2 a jinými ukazateli (na rozdíl od zvýšených sérových koncentrací VEGF, které korelovaly s vyšším B2M, ALC a typem infiltrace kostní dřeně). Koncentrace FGF-2 (opět na rozdíl od VEGF) nesouvisely ani s klinickým průběhem, respektive progresí choroby. Jediným významným nálezem pro FGF-2 byl signifikantní rozdíl koncentrací FGF-2 mezi stádii 0-II dle Raie v rámci skupiny Binet A (124). Žádnou souvislost mezi FGF-2 a klinickými stádii ale nepotvrdili Ho et al., Bairey et al. ani Smolej et al, v jehož pracech nebyla plazmatická koncentrace FGF-2 rozdílná ani v závislosti na pohlaví a počtu leukocytů v periferní krvi (28, 121, 217, 226). Zajímavá je Shanafeltova studie s 311 neléčenými nemocnými s CLL. Zvýšené plazmatické/sérové ani intracelulární koncentrace FGF-2 sice nekorelovaly s klinickými stádii dle Raie, IgVH a CD38, ale u nemocných ve stádiích 0-II dle Raie byl zvýšený poměr FGF-2/trombospondin (inhibitor angiogeneze) spojen s významně kratším TTT (225). Souvislostí FGF-2 s novými prognostickými ukazateli se zabývalo také jen omezené množství prací; výsledky jsou, jak již bylo řečeno, dosti rozporuplné. Vedle již zmíněné Shanafeltovy studie nebyla ani v další studii Molicy et al. prokázána souvislost mezi FGF-2 a pozitivitou ZAP-70, CD38 a nemutovanými IgVH geny (na rozdíl od VEGF) (123). Ani Smolej et al. nezjistili korelaci zvýšených plazmatických koncentrací FGF-2 s expresí ZAP-70 (na rozdíl od VEGF, jehož hladiny byly vyšší u ZAP-70 negativních případů) (227). Další práce Smoleje et al. zjistila významně vyšší plazmatické koncentrace FGF-2 u nemocných s mutovanými geny, koncentrace FGF-2 (ani VEGF) nebyly rozdílné u nemocných v závislosti na cytogenetických aberacích (226). Vedle této poslední jmenované je naše studie jediná, která mimo jiné hodnotí souvislost FGF-2 s cytogenetickými abnormalitami.

V naší studii nebyla nalezena korelace sérových koncentrací FGF-2 a exprese FGFR2.

Byla zjištěna statisticky významně vyšší exprese FGFR2 v kontrolní skupině v porovnání s CLL pacienty. Nemocní s normální LDH i B2M v séru měli statisticky významně vyšší expresi FGFR2 než nemocní se se zvýšenou LDH a B2M. Exprese FGFR2 slabě negativně korelovala s ALC. Další souvislosti FGFR2 s ostatními prognostickými ukazateli a klinickým průběhem CLL nebyly prokázány. Důvodem extrémně nízké exprese FGFR2 v našem

souboru také mohou být zvýšené sérové koncentrace cirkulujícího FGF-2, které v důsledku zpětné vazby mohly vést k poklesu FGFR2. Například u lidských astrocytomů a krysích nádorů prostaty, které jsou oba na FGF-2 růstově závislé, byla progresse nádoru spojena s „down-regulací“ FGFR2 se současnou s „up-regulací“ FGFR1 (125).

V žádné studii nebyla dosud souvislost exprese FGFR2 (resp. FGFR) s prognostickými ukazateli a průběhem CLL studována. Jak již bylo řečeno, existuje velmi omezené množství prací, které se zabývaly hodnocením exprese receptorů pro FGF-2 na lymfocytech CLL; ve většině prací byla studována exprese FGFR obecně na různých typech leukemických buněk a mimo jiné exprese FGFR2 na těchto buňkách (včetně CLL lymfocytů) byla vždy nízká (125, 224, 229, 230). Dostupné práce jsou navíc staršího data, což je poněkud s podivem vzhledem k tomu, že angiogenezi a problematice FGF-2 se u CLL věnuje v několika posledních letech intenzivní pozornost. Dominantně však byla zkoumána především produkce FGF-2 leukemickými buňkami.

Při provedení **multivariantní analýzy pro celkové přežití** vyšly jako statisticky významné a nezávislé dva prognostické faktory, a to sérová koncentrace TNF- α a masivní lymfadenopatie. Význam TNF- α coby negativního prognostického ukazatele v naší práci byl již diskutován. Některé práce prokázaly, že nemocní s masivní lymfadenopatií mají horší prognózu (nižší procento CR, kratší PFS, naznačen i trend směrem ke kratšímu OS, vysoké riziko relapsu po alogenní transplantaci) (16, 45, 47, 50). I naše práce potvrzuje, že nález masivní lymfadenopatie, která byla přítomna u 16 % nemocných a v naprosté většině případů (85 %) se jednalo o retroperitoneální uzliny, má negativní prognostický význam s dopadem na OS. Dalším důležitým zjištěním je fakt, že diagnóza retroperitoneální lymfadenopatie byla ve všech případech založena na UZ vyšetření. Naše nálezy tedy také podporují význam použití zobrazovacích metod (resp. UZ) u CLL.

Tab. 8. Přehled nejdůležitějších studií, u nichž byly prokázány zvýšené plazmatické/sérové koncentrace FGF-2 a jejich souvislost s prognostickými ukazateli.

Autor, rok	CLL	Kontroly	Metodika stanovení FGF-2	Hodnocená CLL stádia	Souvislost s klinickými stádii	Souvislost s moderními prognostickými faktory	Souvislost s klinickým průběhem	Předchozí léčba
Duensing, 1995	18	6	plazma	všechna	ano (vyšší FGF-2 u pokročilých)	x	x	ne
Aguayo, 2000	157	11	plazma	neurčeno	x	x	x	neurčeno
Bairey, 2001	85	0	sérum	všechna	neprokázána	x	x	ano
Krejčí, 2001	39	11	plazma	všechna	x	x	x	ano
Gora-Tybor, 2002	18	16	sérum	všechna	x	x	x	ne
Molica, 2002	81	20	sérum	časná (Binet A)	ano (mezi st. 0-II dle Raie)	x	neprokázána	ne
Gora-Tybor, 2003	80	27	sérum	všechna	ano (vyšší FGF-2 u pokročilých)	x	ano (vyšší FGF-2 u progresu)	ne
Smolej, 2005	18	20	plazma	neurčeno	x	x	x	neurčeno
Shanafelt, 2005	311	0	sérum i plazma	všechna	neprokázána	neprokázána (pro IgVH, CD38)	neprokázána	ne
Smolej, 2006	49	50	plazma	všechna	neprokázána	prokázána pro M-IgVH, neprokázána pro FISH (příznivé vs. nepříznivé aberace)	x	ne
Smolej, 2007	27	0	plazma	všechna	x	neprokázána (pro ZAP-70)	x	ne
Smolej, 2007	73	80	plazma	všechna	neprokázána	x	x	ne
Molica, 2007	47	neurčeno	sérum	časná (Binet A)	x	neprokázána (pro IgVH, ZAP-70, CD38)	x	ne

x – vybraný ukazatel nebyl hodnocen

8.4 Možné nové cílené léčebné směry u CLL

Další výzkum námi vybraných cytokinů a jejich signálních drah je cenný nejen z prognostického, ale také léčebného hlediska.

V rámci preklinických studií byly u CLL použity inhibitory transkripční aktivity NF- κ B.

Inhibitor 17-DMAG (inhibitor heat shock proteinu 90, HSP90) prokázal *in vitro* cytotoxický efekt na CLL lymfocyty s minimální toxicitou na normální B a T-lymfocyty a NK-buňky. Jeho podání vedlo ke snížení vazby NF- κ B na DNA s následným snížením transkripce NF- κ B cílových genů a k navození apoptózy cestou aktivace kaspáz. Podání 17-DMAG bylo provázeno významným snížením počtu leukocytů při použití na myších modelech a prodloužením jejich přežití (234). Použití dalšího NF- κ B inhibitoru PCI-24781 samotného či v kombinaci s bortezomidem (inhibitor proteazomu) vedlo k razantnímu vyvolání apoptózy CLL buněk (235).

Monoklonální protilátky proti TNF- α (infliximab, adalimumab) a fúzní solubilní receptor pro TNF- α etanercept jsou již nyní používány například k léčbě Crohnovy choroby, revmatoidní artritidy či psoriázy (193, 194). K dispozici jsou data o použití etanerceptu v kombinaci s rituximabem u nemocných s relabovanou CLL s poměrně nadějnými výsledky (29 % ORR) (kromě nemocných s del 17p13) (236). Byl publikován i popis případu nemocného s psoriázou a CLL úspěšně léčeného s použitím etanerceptu následovaného podáním infliximabu (237).

Zkušenosti s léčivými brzdícími kancerogenní efekt TGF- β jsou předmětem zájmu zejména u solidních nádorů v rámci klinických studií. V počátečních fázích nádorového bujení je TGF- β účinným inhibitorem tohoto procesu. Například tamoxifen používaný k léčbě rakoviny prsu indukuje produkci TGF- β a bylo prokázáno, že jeho preventivní podávání rizikové skupině žen na výskyt karcinomu může vzniku rakoviny prsu zabránit (140). U pokročilých nádorů, obvykle již odolných na účinek TGF- β , je naopak žádoucí jeho hladinu snížit. K dispozici jsou data o použití tzv. antisense DNA, která je v nádorových buňkách transkribována na RNA pro TGF- β , a ta poté blokuje syntézu TGF- β . Účinné je také použití neutralizujících protilátek proti TGF- β či použití solubilní formy receptorů TGF β RII a TGF β RIII zabraňující vazbou solubilního TGF- β aktivaci signální dráhy TGF- β . Tzv. inhibitory malých molekul brzdí kinázovou aktivitu TGF β R, a tím i aktivaci Smad proteinů (7, 140, 210). Na druhou stranu je nutno podotknout, že zatímco v případě pokročilých solidních nádorů zvýšená hladina TGF- β značí nepříznivou prognózu a terapeutickým cílem je tedy její snížení, u CLL naopak některé studie včetně naší prokázaly, že vyšší hladiny TGF- β jsou spojeny

s prognózou příznivější (9, 140, 217). Otázka léčebného využití výše zmíněných léčiv je tedy u CLL kontroverzní. Zajímavou prací je studie Romana et al., v níž CLL lymfocyty odolné na pro-apoptické působení TGF- β , podlely apoptóze po podání tacrolimu (FK506). FK506 byl schopen aktivovat kinázovou aktivitu TGF β R1 a indukovat Smad2 fosforylaci, což vedlo k významnému snížení exprese anti-apoptických proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L současně se zvýšením exprese proteinů s pro-apoptickým působením (Bim a Bmf) a k navození apoptózy CLL buněk. Standardně je však FK506 užíván jako imunosupresivum (209).

K dispozici jsou rovněž nadějná data z klinických studií využívajících u CLL antiangiogenní léky, jako jsou thalidomid či lenalidomid (128, 164). Tato léčiva kombinují zejména účinky imunomodulační a antiangiogenní. Konkrétně jde například o blokádu VEGF, FGF-2, TNF- α , IL-1, IL-6, adhezivních molekul a dalších cytokinů (117, 127). V preklinických studiích byly využity různé inhibitory tyrosin-kinázové aktivity VEGF receptorů. Slibné se jeví podání Vatalanibu a Pazopanibu v kombinaci s cytostatiky, které vedlo k významnému snížení přežívání CLL buněk. Naopak monoklonální protilátka proti VEGF bevacizumab, která je nyní používání v první linii léčby metastatického kolorektálního karcinomu, neměla u relabujících/refrakterních nemocných s CLL významný efekt (117, 128). Zajímavé je, že také některá klasická cytostatika (například etoposid, cyklofosfamid a další) mají antiangiogenní účinek, zejména jsou-li podávána v nízkých dávkách a v pravidelných intervalech, a to zřejmě v důsledku neustálého supresivního působení na nádorový endotel (117). Vliv „klasické“ cytostatické léčby CLL na ovlivnění hladin proangiogenních cytokinů popisují pouze 2 studie: Gora-Tybor u 18 nemocných s CLL prokázala, že podání kladribinu vede k významného snížení sérových koncentrací FGF-2 i TGF- β (122). Druhou studií je práce Smoleje et al., kteří prokázali, že po intenzivní léčbě CLL založené na fludarabinovém režimu (FC či FCR) došlo u 12 nemocných k významnému poklesu plazmatických koncentrací VEGF i FGF-2 na úroveň kontrolní skupiny (121).

9. Závěry

Dosud nebyla publikována práce, ve které by bylo provedeno tak rozsáhlé hodnocení souvislosti TNF- α , TGF- β 1, TGF β RII, FGF-2 a FGFR2 s prognostickými faktory, klinickým průběhem CLL i souvislostí vzájemných. V tomto jsou naše výsledky prioritní. Cíle naší studie byly splněny s těmito nejdůležitějšími nálezy:

1. Sérové koncentrace TNF- α , TGF- β 1, FGF-2 a lymfocytární exprese TGF β RII a FGFR2 byly detekovatelné ve všech vzorcích.

Sérové koncentrace TNF- α a FGF-2 byly významně vyšší u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou.

Expres FGFR2 byla významně nižší na CLL lymfocytech oproti kontrolní skupině, což mohlo být způsobeno negativní zpětnou vazbou při zvýšených sérových koncentracích důležitého angiogenního aktivátoru FGF-2. Naše práce přispěla k rozšíření dosavadních znalostí o expresi FGFR u CLL; v této oblasti bylo dosud k dispozici naprosté minimum dat. Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v sérových koncentracích TGF- β 1 a expresi TGF β RII u nemocných s CLL a kontrolní skupinou.

2. Ověřili jsme negativní prognostický význam zvýšených sérových koncentrací TNF- α , které vedle klasických prognostických ukazatelů (pokročilá Rai stádia, vysoký B2M, masivní lymfadenopatie) korelovaly také s nejdůležitějšími novými ukazateli ve vztahu k celkovému přežití, a to s nemutovanými IgVH geny a nepříznivými cytogenetickými aberacemi; byla též prokázána souvislost s nepříznivým klinickým průběhem CLL (viz. dále).

Druhým ukazatelem s prokázaným prognostickým významem byla zvýšená sérová koncentrace TGF- β 1, která byla naopak spojena s příznivými nálezy (nízkým rizikem dle Raie, nižším ALC, nepřítomností masivní lymfadenopatie, mutovanými IgVH geny a negativitou ZAP-70) i příznivým klinickým průběhem CLL (viz. dále).

U nemocných s vysokým rizikem dle Raie byla zjištěna významně nižší exprese TGF β RII, která by mohla přispívat k oslabení signalizace TGF- β , zejména ke snížení jeho anti-proliferačního působení na lymfocyty CLL, a tedy k horší prognóze u této skupiny pacientů.

Signifikantně vyšší sérové koncentrace FGF-2 měli nemocní se středním rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým i vysokým rizikem, vyšší FGF-2 koreloval s ALC.

Statisticky významnými a nezávislými prognostickými faktory pro celkové přežití byly v našem souboru zvýšené sérové koncentrace TNF- α a přítomnost masivní lymfadenopatie.

3. Nebyla zjištěna vzájemná souvislost mezi jednotlivými hodnocenými ukazateli.

4. Zvýšené sérové koncentrace TNF- α korelovaly s nepříznivým průběhem onemocnění - progresí choroby a kratším TTT. Zvýšené sérové koncentrace TGF- β 1 byly naopak spojeny s příznivým klinickým průběhem CLL – stabilní chorobou a delším TTT. Souvislost ostatních ukazatelů s klinickým průběhem nebyla prokázána.

Výstupy pro klinickou praxi a výhledy do budoucna:

U nově diagnostikovaných nemocných s CLL by mohlo být vhodné k zpřesnění individuální míry rizika progresu a odhadu nutnosti zahájení léčby vyšetření sérové koncentrace TNF- α . Negativní prognostický význam TNF- α včetně vlivu na celkové přežití byl již opakovaně prokázán. Dalším z důvodů je fakt, že v současné době jsou ve vývoji léčiva antagonizující proliferační a prozánětlivý potenciál TNF- α , která by mohla najít uplatnění i u CLL. Zavedení vyšetření sérových koncentrací TGF- β 1 brání fakt, že naše studie je zatím jedinou, v níž byl příznivý vliv TGF- β 1 potvrzen v souvislosti s novými prognostickými ukazateli. V tomto směru je třeba dalších studií na rozsáhlejší souboru nemocných. Jednoznačnou interpretaci prognostického významu TGF- β u CLL také znesnadňuje vliv změn exprese TGF β R.

Dalším důležitým výstupem naší práce pro klinickou praxi je potvrzení negativního prognostického významu masivní lymfadenopatie. V našem souboru šlo téměř ve všech případech o uzliny retroperitoneální, které byly zjištěny pomocí UZ vyšetření. Ultrasonografické vyšetření je tedy vhodné zavést do rutinní praxe v rámci vstupních diagnostických vyšetření a před zahájením léčby. Pomocí UZ lze jednoduše sledovat dynamiku onemocnění ve smyslu objektivního hodnocení nárůstu velikosti uzlin (zevních i vnitřních; i splenomegalie/hepatomegalie) a určit/zpřesnit léčebnou odpověď. UZ vyšetření je v současné době velmi dobře dostupným, rychlým a bezpečným vyšetřením.

Velkou pozornost do budoucna zaslouží další studie týkající se prognostické hodnoty FGF-2 a jeho receptorů u CLL, neboť do praxe jsou zaváděna nová léčiva s antiangiogenním působením.

U CLL, stejně jako u ostatních hematologických malignit, je jednoznačným trendem hledání nových léčiv, která cíleně působí na signální dráhy hrající roli v proliferaci a odolnosti vůči

apoptóze, neboť na rozdíl od klasické chemoterapie skýtají výhodu zmírnění či úplné eliminace možných nežádoucích účinků vyplývajících z neselektivního působení cytostatik na zdravé tkáně. I z tohoto důvodu je další studium nových prognostických faktorů včetně námi vybraných ukazatelů cenné a užitečné.

10. Literatura

1. GENTILE, M., MAURO, F. R., GUARINI, A., FOA, R. New developments in the diagnosis, prognosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol*, 2005, vol. 17, no. 6, s. 597-604.
2. MOTYČKOVÁ, M., ŽÁK, P., VROBLOVÁ, V., ANDRÝS, C., BELADA, D., SMOLEJ, L., MALÝ, J. Prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie. *Vnitř Lék*, 2011, vol. 57, no. 10, s. 847-857.
3. VAN BOCKSTAELE, F., VERHASSELT, B., PHILIPPE, J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev*, 2009, vol. 23, no. 1, s. 25-47.
4. MORENO, C., MONTSERRAT, E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*, 2008, vol. 22, no. 4, s. 211-219.
5. MONTILLO, M., HAMBLIN, T., HALLEK, M., MONTSERRAT, E., MORRA, E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*, 2005, vol. 90, no. 3, s. 391-399.
6. FERRAJOLI, A., KEATING, M. J., MANSHOURI, T., GILES, F. J., DEY, A., ESTROV, Z., KOLLER, C. A., KURZROCK, R., THOMAS, D. A., FADERL, S., LERNER, S., O'BRIEN, S., ALBITAR, M. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002, vol. 100, no. 4, s. 1215-1219.
7. DONG, M., BLOBE, G. C. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. *Blood*, 2006, vol. 107, no. 12, s. 4589-4596.
8. FRIEDENBERG, W. R., SALZMAN, S. A., PHAN, S. M., BURMESTER, J. K. Transforming growth factor-beta and multidrug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*, 1999, vol. 16, no. 2, s. 110-118.
9. GORA-TYBOR, J., BLONSKI, J. Z., ROBAK, T. Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm*, 2003, vol. 12, no. 3, s. 167-171.
10. BAGUMA-NIBASHEKA, M., LI, A. W., OSMAN, M. S., GELDENUYS, L., CASSON, A. G., TOO, C. K., MURPHY, P. R. Coexpression and regulation of the FGF-2 and FGF antisense genes in leukemic cells. *Leuk Res*, 2005, vol. 29, no. 4, s. 423-433.

11. SMOLEJ, L., ANDRYS, C., MAISNAR, V., POUR, L., MALY, J. Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2005, vol. 48, no. 1, s. 57-58.
12. VROBLOVA, V., SMOLEJ, L., VRBACKY, F., JANKOVICOVA, K., HRUDKOVA, M., MALY, J., KREJSEK, J. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2009, vol. 52, no. 1, s. 3-8.
13. SWERDLOW, S. H., CAMPO, E., HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., PILERI, S. A., STEIN, H., THIELE, J., VARDIMAN, J. W. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th Edition. World Health Organization, 2008. 439 p. ISBN-13: 9789283224310.
14. KLABUSAY, M., HRABČÁKOVÁ, V., STEHLÍKOVÁ, O., PEVNÁ, M., MAYER, J. Role průtokové cytometrie v diagnostice a sledování pacientů s chronickou lymfocytární leukemií. *Transfuze Hematol Dnes*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 45-51.
15. HALLEK, M., CHESON, B. D., CATOVSKY, D., CALIGARIS-CAPPIO, F., DIGHIRO, G., DÖHNER, H., HILLMEN, P., KEATING, M. J., MONTSERRAT, E., RAI, K. R., KIPPS, T. J. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 12, s. 5446-5456.
16. NORIN, S., KIMBY, E., LUNDIN, J. Tumor burden status evaluated by computed tomography scan is of prognostic importance in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*, 2010, vol. 27, no. 3, s. 820-825.
17. GOLDIN, L. R., LANDGREN, O., MARTI, G. E., CAPORASO, N. E. Familial Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia, Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL), and Related Lymphomas. *European J Clin Med Oncol*, 2010, vol. 2, no. 1, s. 119-126.
18. ROBAK, T., JAMROZIAK, K., ROBAK, P. Current and emerging treatments for chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*, 2009, vol. 69, no. 17, s. 2415-2449.
19. PANEESHA, S., MILLIGAN, D. W. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2005, vol. 128, no. 2, s. 145-152.
20. SMOLEJ, L. Modern concepts in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*, 2009, vol. 14, no. 5, s. 249-254.

21. BOYIADZIS, M., FOON, K. A., PAVLETIC, S. Hematopoietic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: potential cure for an incurable disease. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, vol. 7, no. 12, s. 1789-1797.
22. KREJCI, M., ADAM, Z., POUR, L., BRYCHTOVA, Y., MAYER, J., VORLICEK, J. Chronická B-lymfatická leukemie a jí podobné stavy. *Vnitř Lék*, 2009, vol. 55, no. 9, s. 746-765.
23. GINE, E., MARTINEZ, A., VILLAMOR, N., LOPEZ-GUILLERMO, A., CAMOS, M., MARTINEZ, D., ESTEVE, J., CALVO, X., MUNTANOLA, A., ABRISQUETA, P., ROZMAN, M., ROZMAN, C., BOSCH, F., CAMPO, E., MONTSERRAT, E. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*, 2010, vol. 95, no. 9, s. 1526-1533.
24. SMOLEJ, L. Význam mikroprostředí u chronické lymfocytární leukemie. *Transfuzie Hematol Dnes*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 24-28.
25. GERONDAKIS, S., STRASSER, A. The role of Rel/NF-kappaB transcription factors in B lymphocyte survival. *Semin Immunol*, 2003, vol. 15, no. 3, s. 159-166.
26. CHESON, B. D. *Chronic Lymphoid Leukemias: Second Edition, Revised and Expanded*. 2nd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. 625 p. ISBN 0-8247-0543-2. Chapter 6, Apoptosis Dysregulation in Chronic Lymphocytic Leukemia, s. 111-126.
27. CUNI, S., PEREZ-ACIEGO, P., PEREZ-CHACON, G., VARGAS, J. A., SANCHEZ, A., MARTIN-SAAVEDRA, F. M., BALLESTER, S., GARCIA-MARCO, J., JORDA, J., DURANTEZ, A. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*, 2004, vol. 18, no. 8, s. 1391-1400.
28. BAIREY, O., ZIMRA, Y., SHAKLAI, M., RABIZADEH, E. Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2001, vol. 113, no. 2, s. 400-406.
29. CHESON, B. D. *Chronic Lymphoid Leukemias: Second Edition, Revised and Expanded*. 2nd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. 625 p. ISBN 0-8247-0543-2. Chapter 7, Cytokines and Regulatory Molecules in the Pathogenesis and Clinical Course of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia, s. 127-159.

30. HILLMEN, P. Using the biology of chronic lymphocytic leukemia to choose treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, doi: 10.1182/asheducation-2011.1.104.
31. O'BRIEN, S., MOORE, J. O., BOYD, T. E., LARRATT, L. M., SKOTNICKI, A., KOZINER, B., CHANAN-KHAN, A. A., SEYMOUR, J. F., BOCIEK, R. G., PAVLETIC, S., RAI, K. R. Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2007, vol. 25, no. 9, s. 1114-1120.
32. KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus, 2004. 968 s. ISBN 80-86225-50-X. Kapitola 4, Apoptóza a imunitní systém, s. 73-85.
33. MALČÍKOVÁ, J., POSPÍŠILOVÁ, Š., MAYER, J., TRBUŠEK, M. Význam nádorového supresoru p53 u chronické lymfocytární leukemie. *Transfúze Hematol Dnes*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 29-32.
34. HALLEK, M., FISCHER, K., FINGERLE-ROWSON, G., FINK, A. M., BUSCH, R., MAYER, J., HENSEL, M., HOPFINGER, G., HESS, G., VON GRUNHAGEN, U., BERGMANN, M., CATALANO, J., ZINZANI, P. L., CALIGARIS-CAPPIO, F., SEYMOUR, J. F., BERREBI, A., JAGER, U., CAZIN, B., TRNENY, M., WESTERMANN, A., WENDTNER, C. M., EICHHORST, B. F., STAIB, P., BUHLER, A., WINKLER, D., ZENZ, T., BOTTCHE, S., RITGEN, M., MENDILA, M., KNEBA, M., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 2010, vol. 376, no. 9747, s. 1164-1174.
35. MUNZERT, G., KIRCHNER, D., STOBBE, H., BERGMANN, L., SCHMID, R. M., DÖHNER, H., HEIMPEL, H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood*, 2002, vol. 100, no. 10, s. 3749-3756.
36. SHACHAR, I., COHEN, S., MAROM, A., BECKER-HERMAN, S. Regulation of CLL survival by hypoxia-inducible factor and its target genes. *FEBS Lett*, 2012, vol. 586, no. 18, s. 2906-2910.
37. KOZÁK, T. Prognostické faktory chronické lymfocytární leukemie. *Transfúze Hematol Dnes*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 56-61.

38. RAI, K. R., SAWITSKY, A., CRONKITE, E. P., CHANANA, A. D., LEVY, R. N., PASTERNAK, B. S. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1975, vol. 46, no. 2, s. 219-234.
39. BINET, J. L., AUQUIER, A., DIGHIRO, G., CHASTANG, C., PIGUET, H., GOASGUEN, J., VAUGIER, G., POTRON, G., COLONA, P., OBERLING, F., THOMAS, M., TCHERNIA, G., JACQUILLAT, C., BOIVIN, P., LESTY, C., DUAULT, M. T., MONCONDUIT, M., BELABBES, S., GREMY, F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 1981, vol. 48, no. 1, s. 198-206.
40. MONTSERRAT, E. New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006, vol. 2006, no. 1., s. 279-284. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.279.
41. RAI, K. R. A critical analysis of staging in CLL. In: GALE, RP., RAI, K.R. (editors). *Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Direction*. 1st Edition. New York (NY): Alan R Liss, 1987. 432 p. ISBN 10 084512658X, s. 253-264.
42. WAGNER, S. D., CWYNARSKI, K. Chronic lymphocytic leukaemia: new biological markers for assessing prognosis. *Hematol J*, 2004, vol. 5, no. 3, s. 197-201.
43. MUNTAÑOLA, A., BOSCH, F., ARGUIS, P., ARELLANO-RODRIGO, E., AYUSO, C., GINE, E., CRESPO, M., ABRISQUETA, P., MORENO, C., COBO, F., LOPEZ-GUILLERMO, A., MONTSERRAT, E. Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2007, vol. 25, no. 12, s. 1576-1580.
44. EICHHORST, B. F., BUSCH, R., HOPFINGER, G., PASOLD, R., HENSEL, M., STEINBRECHER, C., SIEHL, S., JAGER, U., BERGMANN, M., STILGENBAUER, S., SCHWEIGHOFER, C., WENDTNER, C. M., DOHNER, H., BRITTINGER, G., EMMERICH, B., HALLEK, M. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2006, vol. 107, no. 3, s. 885-891.
45. SMOLEJ, L., BACHH, A., VODÁREK, P., MOTYČKOVÁ, M., ŠIMKOVIČ, M. The role of imaging methods in chronic lymphocytic leukemia: significant internal lymphadenopathy is frequent and associated with shorter overall survival. *Haematologica*, 2012, vol. 97, no. 1, s. 302.
46. BLUM, K. A., YOUNG, D., BROERING, S., LUCAS, M. S., FISCHER, B., LIN, T. S., GREVER, M. R., BYRD, J. C. Computed tomography scans do not improve the

- predictive power of 1996 national cancer institute sponsored working group chronic lymphocytic leukemia response criteria. *J Clin Oncol*, 2007, vol. 25, no. 35, s. 5624-5629.
47. EICHHORST, B. F., FISCHER, K., FINK, A. M., ELTER, T., WENDTNER, C. M., GOEDE, V., BERGMANN, M., STILGENBAUER, S., HOPFINGER, G., RITGEN, M., BAHLO, J., BUSCH, R., HALLEK, M. Limited clinical relevance of imaging techniques in the follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia: results of a meta-analysis. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 6, s. 1817-1821.
 48. HAMBLIN, T. J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007, vol. 20, no. 3, s. 455-468.
 49. DÖHNER, H., STILGENBAUER, S., JAMES, M. R., BENNER, A., WEILGUNI, T., BENTZ, M., FISCHER, K., HUNSTEIN, W., LICHTER, P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, 1997, vol. 89, no. 7, s. 2516-2522.
 50. SORROR, M. L., STORER, B. E., SANDMAIER, B. M., MARIS, M., SHIZURU, J., MAZIARZ, R., AGURA, E., CHAUNCEY, T. R., PULSIPHER, M. A., MCSWEENEY, P. A., WADE, J. C., BRUNO, B., LANGSTON, A., RADICH, J., NIEDERWIESER, D., BLUME, K. G., STORB, R., MALONEY, D. G. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol*, 2008, vol. 26, no. 30, s. 4912-4920.
 51. ZENT, C. S., DING, W., SCHWAGER, S. M., REINALDA, M. S., HOYER, J. D., JELINEK, D. F., TSCHUMPER, R. C., BOWEN, D. A., CALL, T. G., SHANAFELT, T. D., KAY, N. E., SLAGER, S. L. The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. *Br J Haematol*, 2008, vol. 141, no. 5, s. 615-621.
 52. KYASA, M. J., PARRISH, R. S., SCHICHMAN, S. A., ZENT, C. S. Autoimmune cytopenia does not predict poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol*, 2003, vol. 74, no. 1, s. 1-8.
 53. HUS, I., PODHORECKA, M., BOJARSKA-JUNAK, A., ROLINSKI, J., SCHMITT, M., SIEKLUCKA, M., WASIK-SZCZEPANEK, E., DMOSZYNSKA, A. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol*, 2006, vol. 17, no. 4, s. 683-690.

54. WIERDA, W. New prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2009, vol. 7, no. 1, s. 32-33, 42.
55. MOLICA, S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma*, 2006, vol. 47, no. 8, s. 1477-1480.
56. MOLICA, S., BRUGIATELLI, M., CALLEA, V., MORABITO, F., LEVATO, D., NOBILE, F., ALBERTI, A. Comparison of younger versus older B-cell chronic lymphocytic leukemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. *Eur J Haematol*, 1994, vol. 52, no. 4, s. 216-221.
57. WIERDA, W. G., O'BRIEN, S., WANG, X., FADERL, S., FERRAJOLI, A., DO, K. A., CORTES, J., THOMAS, D., GARCIA-MANERO, G., KOLLER, C., BERAN, M., GILES, F., RAVANDI, F., LERNER, S., KANTARJIAN, H., KEATING, M. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 11, s. 4679-4685.
58. MONTSERRAT, E., SANCHEZ-BISONO, J., VINOLAS, N., ROZMAN, C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol*, 1986, vol. 62, no. 3, s. 567-575.
59. GRAY, J. L., JACOBS, A., BLOCK, M. Bone marrow and peripheral blood lymphocytosis in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1974, vol. 33, no. 4, s. 1169-1178.
60. D'ARENA, G., D'AURIA, F., SIMEON, V., LAURENTI, L., DEAGLIO, S., MANSUETO, G., DEL PRINCIPE, M. I., STATUTO, T., PIETRANTUONO, G., GUARIGLIA, R., INNOCENTI, I., MARTORELLI, M. C., VILLANI, O., DE FEO, V., DEL POETA, G., MUSTO, P. 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, vol. 87, no. 6, s. 628-631.
61. MOLICA, S., MAURO, F. R., CALLEA, V., GIANNARELLI, D., LAURIA, F., ROTOLI, B., CORTELEZZI, A., LISO, V., FOA, R. The utility of a prognostic index for predicting time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia: the GIMEMA experience. *Haematologica*, 2010, vol. 95, no. 3, s. 464-469.
62. SHANAFELT, T. D., JENKINS, G., CALL, T. G., ZENT, C. S., SLAGER, S., BOWEN, D. A., SCHWAGER, S., HANSON, C. A., JELINEK, D. F., KAY, N. E. Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2009, vol. 115, no. 2, s. 363-372.

63. BULIAN, P., TARNANI, M., ROSSI, D., FORCONI, F., DEL POETA, G., BERTONI, F., ZUCCA, E., MONTILLO, M., POZZATO, G., DEAGLIO, S., D'ARENA, G., EFREMOV, D., MARASCA, R., LAURIA, F., GATTEI, V., GAIDANO, G., LAURENTI, L. Multicentre validation of a prognostic index for overall survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Oncol*, 2011, vol. 29, no. 2, s. 91-99.
64. GENTILE, M., CUTRONA, G., NERI, A., MOLICA, S., FERRARINI, M., MORABITO, F. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*, 2009, vol. 94, no. 6, s. 887-888.
65. MOLICA, S., LEVATO, D., CASCAVILLA, N., LEVATO, L., MUSTO, P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*, 1999, vol. 62, no. 2, s. 117-122.
66. HALLEK, M., LANGENMAYER, I., NERL, C., KNAUF, W., DIETZFELBINGER, H., ADORF, D., OSTWALD, M., BUSCH, R., KUHN-HALLEK, I., THIEL, E., EMMERICH, B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999, vol. 93, no. 5, s. 1732-1737.
67. HALLEK, M., WANDERS, L., OSTWALD, M., BUSCH, R., SENEKOWITSCH, R., STERN, S., SCHICK, H. D., KUHN-HALLEK, I., EMMERICH, B. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*, 1996, vol. 22, no. 5-6, s. 439-447.
68. ROZMAN, C., MONTSERRAT, E., RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. M., AYATS, R., VALLESPI, T., PARODY, R., RIOS, A., PRADOS, D., MOREY, M., GOMIS, F., ET AL. Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood*, 1984, vol. 64, no. 3, s. 642-648.
69. BERKOVÁ, A., MICHALOVÁ, K. Cytogenetické nálezy u chronické lymfocytární leukemie (CLL). *Transfúze Hematol Dnes*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 52-55.
70. ZENZ, T., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S. Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007, vol. 20, no. 3, s. 439-453.

71. DÖHNER, H., STILGENBAUER, S., BENNER, A., LEUPOLT, E., KRÖBER, A., BULLINGER, L., DOHNER, K., BENTZ, M., LICHTER, P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2000, vol. 343, no. 26, s. 1910-1916.
72. ROBERT, K. H., GAHRTON, G., FRIBERG, K., ZECH, L., NILSSON, B. Extra chromosome 12 and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Haematol*, 1982, vol. 28, no. 2, s. 163-168.
73. JANKOVIČOVÁ, K., KREJSEK, J., KOPECKÝ, O., VOGLOVÁ, J., ŠKRABKOVÁ, Z., NOVOSAD, J. Hodnocení apoptózy buněk akutní myeloidní leukemie a B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie po kultivaci s cytostatiky a její vztah k mnohočetné rezistenci. *Vnitř Lék*, 2005, vol. 51, no. 2, s. 175-182.
74. TAM, C. S., OTERO-PALACIOS, J., ABRUZZO, L. V., JORGENSEN, J. L., FERRAJOLI, A., WIERDA, W. G., LERNER, S., O'BRIEN, S., KEATING, M. J. Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol*, 2008, vol. 141, no. 1, s. 36-40.
75. NEILSON, J. R., AUER, R., WHITE, D., BIENZ, N., WATERS, J. J., WHITTAKER, J. A., MILLIGAN, D. W., FEGAN, C. D. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*, 1997, vol. 11, no. 11, s. 1929-1932.
76. ROSSI, D., CERRI, M., DEAMBROGI, C., SOZZI, E., CRESTA, S., RASI, S., DE PAOLI, L., SPINA, V., GATTEI, V., CAPELLO, D., FORCONI, F., LAURIA, F., GAIDANO, G. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*, 2009, vol. 15, no. 3, s. 995-1004.
77. LIN, T. S., RUPPERT, A. S., JOHNSON, A. J., FISCHER, B., HEEREMA, N. A., ANDRITSOS, L. A., BLUM, K. A., FLYNN, J. M., JONES, J. A., HU, W., MORAN, M. E., MITCHELL, S. M., SMITH, L. L., WAGNER, A. J., RAYMOND, C. A., SCHAAF, L. J., PHELPS, M. A., VILLALONA-CALERO, M. A., GREVER, M. R., BYRD, J. C. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J Clin Oncol*, 2009, vol. 27, no. 35, s. 6012-6018.
78. DOUBEK, M., JUNGOVÁ, A., BREJCHA, M., PANOVSÁ, A., BRYCHTOVÁ, Y., POSPÍŠIL, Z., MAYER, J., ZA ČESKOU LEUKEMICKOU SKUPINU - PRO

- ŽIVOT (CELL, T. C. L. S. G.-F. L. Alemtuzumab v terapii chronické lymfocytární leukemie: retrospektivní analýza a hodnocení léčebné odpovědi podle cytogenetického rizika. *Vnitř Lék*, 2009, vol. 55, no. 6, s. 549-554.
79. HILLMEN, P., SKOTNICKI, A. B., ROBAK, T., JAKSIC, B., DMOSZYNSKA, A., WU, J., SIRARD, C., MAYER, J. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2007, vol. 25, no. 35, s. 5616-5623.
80. SCHETELIG, J., VAN BIEZEN, A., BRAND, R., CABALLERO, D., MARTINO, R., ITALA, M., GARCIA-MARCO, J. A., VOLIN, L., SCHMITZ, N., SCHWERDTFEGER, R., GANSER, A., ONIDA, F., MOHR, B., STILGENBAUER, S., BORNHAUSER, M., DE WITTE, T., DREGER, P. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion: a retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation analysis. *J Clin Oncol*, 2008, vol. 26, no. 31, s. 5094-5100.
81. ROSENWALD, A., ALIZADEH, A. A., WIDHOPF, G., SIMON, R., DAVIS, R. E., YU, X., YANG, L., PICKERAL, O. K., RASSENTI, L. Z., POWELL, J., BOTSTEIN, D., BYRD, J. C., GREVER, M. R., CHESON, B. D., CHIORAZZI, N., WILSON, W. H., KIPPS, T. J., BROWN, P. O., STAUDT, L. M. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 2001, vol. 194, no. 11, s. 1639-1647.
82. SMOLEJ, L., ŠPACEK, M., SAUDKOVÁ, L., KOZÁK, T. ZAP-70 u chronické B-lymfocytární leukemie: klinický význam a metody detekce. *Vnitř Lék*, 2006, vol. 52, no. 12, s. 1194-1199.
83. HAMBLIN, T. J., DAVIS, Z., GARDINER, A., OSCIER, D. G., STEVENSON, F. K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999, vol. 94, no. 6, s. 1848-1854.
84. DAMLE, R. N., WASIL, T., FAIS, F., GHIOTTO, F., VALETTO, A., ALLEN, S. L., BUCHBINDER, A., BUDMAN, D., DITTMAR, K., KOLITZ, J., LICHTMAN, S. M., SCHULMAN, P., VINCIGUERRA, V. P., RAI, K. R., FERRARINI, M., CHIORAZZI, N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999, vol. 94, no. 6, s. 1840-1847.
85. VASCONCELOS, Y., DAVI, F., LEVY, V., OPPEZZO, P., MAGNAC, C., MICHEL, A., YAMAMOTO, M., PRITSCH, O., MERLE-BERAL, H., MALOUM, K., AJCHENBAUM-CYMBALISTA, F., DIGHIERO, G. Binet's staging system and

- VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2003, vol. 21, no. 21, s. 3928-3932.
86. KRÖBER, A., SEILER, T., BENNER, A., BULLINGER, L., BRUCKLE, E., LICHTER, P., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002, vol. 100, no. 4, s. 1410-1416.
 87. HAMBLIN, T. J., ORCHARD, J. A., IBBOTSON, R. E., DAVIS, Z., THOMAS, P. W., STEVENSON, F. K., OSCIER, D. G. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, 2002, vol. 99, no. 3, s. 1023-1029.
 88. KRÖBER, A., BLOEHDORN, J., HAFNER, S., BUHLER, A., SEILER, T., KIENLE, D., WINKLER, D., BANGERTER, M., SCHLENK, R. F., BENNER, A., LICHTER, P., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2006, vol. 24, no. 6, s. 969-975.
 89. DEL PRINCIPE, M. I., DEL POETA, G., BUCCISANO, F., MAURILLO, L., VENDITTI, A., ZUCCHETTO, A., MARINI, R., NISCOLA, P., CONSALVO, M. A., MAZZONE, C., OTTAVIANI, L., PANETTA, P., BRUNO, A., BOMBEN, R., SUPPO, G., DEGAN, M., GATTEI, V., DE FABRITIIS, P., CANTONETTI, M., LO COCO, F., DEL PRINCIPE, D., AMADORI, S. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 3, s. 853-861.
 90. VROBLOVA, V., VRBACKY, F., HRUDKOVA, M., JANKOVICOVA, K., SCHMITZOVA, D., MALY, J., KREJSEK, J., SMOLEJ, L. Significant change in ZAP-70 expression during the course of chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*, 2010, vol. 84, no. 6, s. 513-517.
 91. NÜCKEL, H., HUTTMANN, A., KLEIN-HITPASS, L., SCHROERS, R., FUHRER, A., SELLMANN, L., DUHRSEN, U., DURIG, J. Lipoprotein lipase expression is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2006, vol. 47, no. 6, s. 1053-1061.
 92. OPPEZZO, P., VASCONCELOS, Y., SETTEGRANA, C., JEANNEL, D., VUILLIER, F., LEGARFF-TAVERNIER, M., KIMURA, E. Y., BECHET, S.,

- DUMAS, G., BRISSARD, M., MERLE-BERAL, H., YAMAMOTO, M., DIGHIRO, G., DAVI, F. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2005, vol. 106, no. 2, s. 650-657.
93. HEINTEL, D., KIENLE, D., SHEHATA, M., KROBER, A., KROEMER, E., SCHWARZINGER, I., MITTEREGGER, D., LE, T., GLEISS, A., MANNHALTER, C., CHOTT, A., SCHWARZMEIER, J., FONATSCH, C., GAIGER, A., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S., JAGER, U. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2005, vol. 19, no. 7, s. 1216-1223.
94. MALOUM, K., SETTEGRANA, C., CHAPIRO, E., CAZIN, B., LEPRETRE, S., DELMER, A., LEPORRIER, M., DREYFUS, B., TOURNILHAC, O., MAHE, B., NGUYEN-KHAC, F., LESTY, C., DAVI, F., MERLE-BERAL, H. IGHV gene mutational status and LPL/ADAM29 gene expression as clinical outcome predictors in CLL patients in remission following treatment with oral fludarabine plus cyclophosphamide. *Ann Hematol*, 2009, vol. 88, no. 12, s. 1215-1221.
95. JOSEFSSON, P., GEISLER, C. H., LEFFERS, H., PETERSEN, J. H., ANDERSEN, M. K., JURLANDER, J., BUHL, A. M. CLLU1 expression analysis adds prognostic information to risk prediction in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 11, s. 4973-4979.
96. BUHL, A. M., JURLANDER, J., GEISLER, C. H., PEDERSEN, L. B., ANDERSEN, M. K., JOSEFSSON, P., PETERSEN, J. H., LEFFERS, H. CLLU1 expression levels predict time to initiation of therapy and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*, 2006, vol. 76, no. 6, s. 455-464.
97. KOTASKOVA, J., TICHY, B., TRBUSEK, M., FRANCOVA, H. S., KABATHOVA, J., MALCIKOVA, J., DOUBEK, M., BRYCHTOVA, Y., MAYER, J., POSPISILOVA, S. High expression of lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) in chronic lymphocytic leukemia cells is associated with unmutated immunoglobulin variable heavy chain region (IGHV) gene and reduced treatment-free survival. *J Mol Diagn*, 2010, vol. 12, no. 3, s. 328-334.
98. NÜCKEL, H., REBMANN, V., DURIG, J., DUHRSEN, U., GROSSE-WILDE, H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 4, s. 1694-1698.
99. PEREZ-CHACON, G., ROSADO, S., REBOLLEDA, N., LOSADA-FERNANDEZ, I., VARGAS, J. A., MORADO, M., JORDA, J., PEREZ-ACIEGO, P. Prognostic

- irrelevance of HLA-G in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol*, 2009, vol. 31, no. 3, s. 327-337.
100. MAJID, A., LIN, T. T., BEST, G., FISHLOCK, K., HEWAMANA, S., PRATT, G., YALLOP, D., BUGGINS, A. G., WAGNER, S., KENNEDY, B. J., MIALL, F., HILLS, R., DEVEREUX, S., OSCIER, D. G., DYER, M. J., FEGAN, C., PEPPER, C. CD49d is an independent prognostic marker that is associated with CXCR4 expression in CLL. *Leuk Res*, 2011, vol. 35, no. 6, s. 750-756.
101. NÜCKEL, H., SWITALA, M., COLLINS, C. H., SELLMANN, L., GROSSEWILDE, H., DUHRSEN, U., REBMANN, V. High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Immunol*, 2009, vol. 131, no. 3, s. 472-480.
102. MRÁZ, M., POSPÍŠILOVÁ, Š., MAYER, J. MicroRNA v patogenezi chronické lymfocytární leukemie a jejich prognostický význam. *Transfúze Hematol Dnes*, 2010, vol. 16, no. 1, s. 33-35.
103. HÁJEK, R., KUNICKÁ, Z., SKLENIČKOVÁ, M., DVOŘÁČKOVÁ, M., FAJKUS, J., SMEJKALOVÁ, J., KREJČÍ, M., POUR, L., OČADLÍKOVÁ, D., WEISSOVÁ, D., VIGÁŠOVÁ, J., KOVÁŘOVÁ, L., DUDOVÁ, S., HEINIGOVÁ, J., VIDLÁKOVÁ, P., ADAM, Z., PENKA, M. Stanovení aktivity telomerázy u mnohočetného myelomu. *Klin Onkol*, 2005, vol. 18, no. 3, s. 80 – 83.
104. BREZINOVA, J., BERKOVA, A., VCELIKOVA, S., ZEMANOVA, Z., IZAKOVA, S., SAROVA, I., CECHOVA, H., TAJTLOVA, J., GROSOVA, L., LIZCOVA, L., MALINOVA, E., ZEMANOVA, M., CMUNT, E., KARBAN, J., TRNENY, M., SCHWARZ, J., MICHALOVA, K. Telomere length, molecular cytogenetic findings, and immunophenotypic features in previously untreated patients with B-chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*, 2010, vol. 57, no. 3, s. 215-221.
105. ZENZ, T., HOTH, P., BUSCH, R., AL., HELFRICH, H., WINKLER, D., BUHLER, A., PATTEN, A., TRUONG, S., WU, L., ROWSON, G. F., FISCHER, K., FINK, AM., JAGER, U., BÖTTCHER, S., KNEBA, M., WENGER, M. K., MENDILA, M., HALLEK, M., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S. TP53 Mutations and Outcome After Fludarabine and Cyclophosphamide (FC) or FC Plus Rituximab (FCR) in the CLL8 Trial of the GCLLSG. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2009, vol.114, no. 22, abstract 1267. Print ISSN: 0006-4971. Online ISSN: 1528-0020.
106. MALCIKOVA, J., SMARDOVA, J., ROCNOVA, L., TICHY, B., KUGLIK, P., VRANOVA, V., CEJKOVA, S., SVITAKOVA, M., SKUHROVA FRANCOVA, H.,

- BRYCHTOVA, Y., DOUBEK, M., BREJCHA, M., KLABUSAY, M., MAYER, J., POSPISILOVA, S., TRBUSEK, M. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*, 2009, vol. 114, no. 26, s. 5307-5314.
107. ZENZ, T., KRÖBER, A., SCHERER, K., HABE, S., BUHLER, A., BENNER, A., DENZEL, T., WINKLER, D., EDELMANN, J., SCHWANEN, C., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 8, s. 3322-3329.
108. FABBRI, G., RASI, S., ROSSI, D., TRIFONOV, V., KHIABANIAN, H., MA, J., GRUNN, A., FANGAZIO, M., CAPELLO, D., MONTI, S., CRESTA, S., GARGIULO, E., FORCONI, F., GUARINI, A., ARCAINI, L., PAULLI, M., LAURENTI, L., LAROCCA, L. M., MARASCA, R., GATTEI, V., OSCIER, D., BERTONI, F., MULLIGHAN, C. G., FOA, R., PASQUALUCCI, L., RABADAN, R., DALLA-FAVERA, R., GAIDANO, G. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*, 2011, vol. 208, no. 7, s. 1389-1401.
109. ROSATI, E., SABATINI, R., RAMPINO, G., TABILIO, A., DI IANNI, M., FETTUCCIARI, K., BARTOLI, A., COACCIOLI, S., SCREPANTI, I., MARCONI, P. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 4, s. 856-865.
110. PUENTE, X. S., PINYOL, M., QUESADA, V., CONDE, L., ORDONEZ, G. R., VILLAMOR, N., ESCARAMIS, G., JARES, P., BEA, S., GONZALEZ-DIAZ, M., BASSAGANYAS, L., BAUMANN, T., JUAN, M., LOPEZ-GUERRA, M., COLOMER, D., TUBIO, J. M., LOPEZ, C., NAVARRO, A., TORNADOR, C., AYMERICH, M., ROZMAN, M., HERNANDEZ, J. M., PUENTE, D. A., FREIJE, J. M., VELASCO, G., GUTIERREZ-FERNANDEZ, A., COSTA, D., CARRIO, A., GUIJARRO, S., ENJUANES, A., HERNANDEZ, L., YAGUE, J., NICOLAS, P., ROMEO-CASABONA, C. M., HIMMELBAUER, H., CASTILLO, E., DOHM, J. C., DE SANJOSE, S., PIRIS, M. A., DE ALAVA, E., SAN MIGUEL, J., ROYO, R., GELPI, J. L., TORRENTS, D., OROZCO, M., PISANO, D. G., VALENCIA, A., GUIGO, R., BAYES, M., HEATH, S., GUT, M., KLATT, P., MARSHALL, J., RAINE, K., STEBBINGS, L. A., FUTREAL, P. A., STRATTON, M. R., CAMPBELL, P. J., GUT, I., LOPEZ-GUILLERMO, A., ESTIVILL, X.,

- MONTSERRAT, E., LOPEZ-OTIN, C., CAMPO, E. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 2011, vol. 475, no. 7354, s. 101-105.
111. ROSSI, D., RASI, S., FABBRI, G., SPINA, V., FANGAZIO, M., FORCONI, F., MARASCA, R., LAURENTI, L., BRUSCAGGIN, A., CERRI, M., MONTI, S., CRESTA, S., FAMA, R., DE PAOLI, L., BULIAN, P., GATTEI, V., GUARINI, A., DEAGLIO, S., CAPELLO, D., RABADAN, R., PASQUALUCCI, L., DALLA-FAVERA, R., FOA, R., GAIDANO, G. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 2, s. 521-529.
112. VILLAMOR, N., CONDE, L., MARTINEZ-TRILLOS, A., CAZORLA, M., NAVARRO, A., BEA, S., LOPEZ, C., COLOMER, D., PINYOL, M., AYMERICH, M., ROZMAN, M., ABRISQUETA, P., BAUMANN, T., DELGADO, J., GINE, E., GONZALEZ-DIAZ, M., HERNANDEZ, J. M., COLADO, E., PAYER, A. R., RAYON, C., NAVARRO, B., JOSE TEROL, M., BOSCH, F., QUESADA, V., PUENTE, X. S., LOPEZ-OTIN, C., JARES, P., PEREIRA, A., CAMPO, E., LOPEZ-GUILLERMO, A. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*, 2012. doi: 10.1038/leu.2012.357. [Epub ahead of print].
113. WANG, L., LAWRENCE, M. S., WAN, Y., STOJANOV, P., SOUGNEZ, C., STEVENSON, K., WERNER, L., SIVACHENKO, A., DELUCA, D. S., ZHANG, L., ZHANG, W., VARTANOV, A. R., FERNANDES, S. M., GOLDSTEIN, N. R., FOLCO, E. G., CIBULSKIS, K., TESAR, B., SIEVERS, Q. L., SHEFLER, E., GABRIEL, S., HACOEN, N., REED, R., MEYERSON, M., GOLUB, T. R., LANDER, E. S., NEUBERG, D., BROWN, J. R., GETZ, G., WU, C. J. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2011, vol. 365, no. 26, s. 2497-2506.
114. ROSSI, D., BRUSCAGGIN, A., SPINA, V., RASI, S., KHIABANIAN, H., MESSINA, M., FANGAZIO, M., VAISITTI, T., MONTI, S., CHIARETTI, S., GUARINI, A., DEL GIUDICE, I., CERRI, M., CRESTA, S., DEAMBROGI, C., GARGIULO, E., GATTEI, V., FORCONI, F., BERTONI, F., DEAGLIO, S., RABADAN, R., PASQUALUCCI, L., FOA, R., DALLA-FAVERA, R., GAIDANO, G. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia:

- association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 26, s. 6904-6908.
115. ROSSI, D., FANGAZIO, M., RASI, S., VAISITTI, T., MONTI, S., CRESTA, S., CHIARETTI, S., DEL GIUDICE, I., FABBRI, G., BRUSCAGGIN, A., SPINA, V., DEAMBROGI, C., MARINELLI, M., FAMA, R., GRECO, M., DANIELE, G., FORCONI, F., GATTEI, V., BERTONI, F., DEAGLIO, S., PASQUALUCCI, L., GUARINI, A., DALLA-FAVERA, R., FOA, R., GAIDANO, G. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 12, s. 2854-2862.
 116. FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 2002, vol. 29, no. 6 Suppl 16, s. 15-18.
 117. SMOLEJ, L., BENEŠOVÁ, P. Význam angiogeneze u maligních nádorů. *Acta Medica (Hradec Kralove) Suppl*, 2005, vol. 48, no. 2, s. 69-72.
 118. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971, vol. 285, no. 21, s. 1182-1186.
 119. KAY, N. E., BONE, N. D., TSCHUMPER, R. C., HOWELL, K. H., GEYER, S. M., DEWALD, G. W., HANSON, C. A., JELINEK, D. F. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*, 2002, vol. 16, no. 5, s. 911-919.
 120. DUENSING, S., ATZPODIEN, J. Increased intracellular and plasma levels of basic fibroblast growth factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1995, vol. 85, no. 7, s. 1978-1980.
 121. SMOLEJ, L., ANDRÝS, C., KREJSEK, J., BELADA, D., ŽÁK, P., ŠIROKÝ, O., MALÝ, J. Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a cévní endotelový růstový faktor (VEGF) jsou zvýšeny v plazmě periferní krve nemocných s chronickou lymfocytární leukemií a klesají po intenzivní léčbě obsahující fludarabin. *Vnitř Lék*, 2007, vol. 53, no. 11, s. 1171-1176.
 122. GORA-TYBOR, J., BLONSKI, J. Z., ROBAK, T. Cladribine decreases the level of angiogenic factors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*, 2002, vol. 49, no. 3, s. 145-148.
 123. MOLICA, S., CUTRONA, G., VITELLI, G., MIRABELLI, R., MOLICA, M., DIGIESI, G., RIBATTI, D., FERRARINI, M., VACCA, A. Markers of increased angiogenesis and their correlation with biological parameters identifying high-risk

- patients in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, 2007, vol. 31, no. 11, s. 1575-1578.
124. MOLICA, S., VITELLI, G., LEVATO, D., RICCIOTTI, A., DIGIESI, G. Clinicoprognostic implications of increased serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer*, 2002, vol. 86, no. 1, s. 31-35.
 125. KREJCI, P., DVORAKOVA, D., KRAHULCOVA, E., PACHERNIK, J., MAYER, J., HAMPL, A., DVORAK, P. FGF-2 abnormalities in B cell chronic lymphocytic and chronic myeloid leukemias. *Leukemia*, 2001, vol. 15, no. 2, s. 228-237.
 126. AGUAYO, A., KANTARJIAN, H., MANSHOURI, T., GIDEL, C., ESTEY, E., THOMAS, D., KOLLER, C., ESTROV, Z., O'BRIEN, S., KEATING, M., FREIREICH, E., ALBITAR, M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2000, vol. 96, no. 6, s. 2240-2245.
 127. POUR, L., HÁJEK, R., BUCHLER, T., MAISNAR, V., SMOLEJ, L. Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů. *Vnitř Lék*, 2004, vol. 50, no. 12, s. 930-938.
 128. XIA, Y., LU, R. N., LI, J. Angiogenic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, 2012, vol. 36, no. 10, s. 1211-1217.
 129. BAIREY, O., BOYCOV, O., KAGANOVSKY, E., ZIMRA, Y., SHAKLAI, M., RABIZADEH, E. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res*, 2004, vol. 28, no. 3, s. 243-248.
 130. GORA-TYBOR, J., BLONSKI, J. Z., ROBAK, T. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur Cytokine Netw*, 2005, vol. 16, no. 1, s. 41-46.
 131. OKADA-BAN, M., THIERY, J. P., JOUANNEAU, J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, vol. 32, no. 3, s. 263-267.
 132. LETILOVIC, T., VRHOVAC, R., VERSTOVSEK, S., JAKSIC, B., FERRAJOLI, A. Role of angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2006, vol. 107, no. 5, s. 925-934.
 133. SHANAFELT, T. D., BYRD, J. C., LA, P. B., ZENT, C. S., CALL, T., SECRETO, C., GREVER, M. R., LIN, T. S., KAY, N. E. Pretreatment angiogenic cytokines predict response to chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2009, vol. 146, no. 6, s. 660-664.

134. SMOLEJ, L., ANDRÝS, C., BELADA, D., HRUDKOVÁ, M., KREJSEK, J., MALÝ, J. Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu mají prognostický význam u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. *Transfuz Hematol Dnes*, 2008, vol. 14, no. 1, s. 24-27.
135. LEBRIN, F., GOUMANS, M. J., JONKER, L., CARVALHO, R. L., VALDIMARSDOTTIR, G., THORIKAY, M., MUMMERY, C., ARTHUR, H. M., TEN DIJKE, P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J*, 2004, vol. 23, no. 20, s. 4018-4028.
136. VRBACKY, F., SMOLEJ, L., VROBLOVA, V., PEKOVA, S., HRUDKOVA, M., CERVINKA, M., PECKA, M., KREJSEK, J., MALY, J. Angiopoietin-2 mRNA expression is increased in chronic lymphocytic leukemia patients with poor prognostic features. *Hematology*, 2010, vol. 15, no. 4, s. 210-214.
137. MAFFEI, R., MARTINELLI, S., SANTACHIARA, R., ROSSI, D., GUARNOTTA, C., SOZZI, E., ZUCCHETTO, A., RIGOLIN, G. M., FIORCARI, S., CASTELLI, I., FONTANA, M., COLUCCIO, V., LEONARDI, G., ZUCCHINI, P., TRIPODO, C., CUNEO, A., GATTEI, V., DEL POETA, G., FORCONI, F., GAIDANO, G., TORELLI, G., MARASCA, R. Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 4, s. 584-592.
138. MAFFEI, R., MARTINELLI, S., CASTELLI, I., SANTACHIARA, R., ZUCCHINI, P., FONTANA, M., FIORCARI, S., BONACORSI, G., ILARIUCCI, F., TORELLI, G., MARASCA, R. Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leuk Res*, 2010, vol. 34, no. 3, s. 312-321.
139. MARTINELLI, S., MAFFEI, R., CASTELLI, I., SANTACHIARA, R., ZUCCHINI, P., FONTANA, M., BONACORSI, G., LEONARDI, G., MARASCA, R., TORELLI, G. Increased expression of angiopoietin-2 characterizes early B-cell chronic lymphocytic leukemia with poor prognosis. *Leuk Res*, 2008, vol. 32, no. 4, s. 593-597.
140. FUCHS, O. Úloha signální dráhy indukované transformačním růstovým faktorem beta při vzniku nádoru. *Klin Onkol*, 2002, vol. 15, no. 1, s. 7 – 16.
141. PERTOVAARA, L., KAIPAINEN, A., MUSTONEN, T., ORPANA, A., FERRARA, N., SAKSELA, O., ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*, 1994, vol. 269, no. 9, s. 6271-6274.

142. BADOUX, X. C., KEATING, M. J., WEN, S., WIERDA, W. G., O'BRIEN, S. M., FADERL, S., SARGENT, R., BURGER, J. A., FERRAJOLI, A. Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2013, vol. 31, no. 5, s. 584-591.
143. GROUP, C. T. C. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst*, 1999, vol. 91, no. 10, s. 861-868.
144. PETTITT, A. R. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2003, vol. 121, no. 5, s. 692-702.
145. STEURER, M., PALL, G., RICHARDS, S., SCHWARZER, G., BOHLIUS, J., GREIL, R. Purine antagonists for chronic lymphocytic leukaemia. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006, no. 3, s. CD004270. doi: 10.1002/14651858.CD004270.pub2.
146. CATOVSKY, D., RICHARDS, S., MATUTES, E., OSCIER, D., DYER, M. J., BEZARES, R. F., PETTITT, A. R., HAMBLIN, T., MILLIGAN, D. W., CHILD, J. A., HAMILTON, M. S., DEARDEN, C. E., SMITH, A. G., BOSANQUET, A. G., DAVIS, Z., BRITO-BABAPULLE, V., ELSE, M., WADE, R., HILLMEN, P. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*, 2007, vol. 370, no. 9583, s. 230-239.
147. FLINN, I. W., NEUBERG, D. S., GREVER, M. R., DEWALD, G. W., BENNETT, J. M., PAIETTA, E. M., HUSSEIN, M. A., APPELBAUM, F. R., LARSON, R. A., MOORE, D. F., JR., TALLMAN, M. S. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol*, 2007, vol. 25, no. 7, s. 793-798.
148. CHESON, B. D. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, vol. 55, no. 2, s. 188-196.
149. ROBAK, T., MOISEEV, S. I., DMOSZYNSKA, A., SOLAL-CÉLIGNY, P., WARZOCHA, K., LOSCERTALES, J., CATALANO, J., AFANASIEV, B. V., LARRATT, L., GEISLER, CH., MONTILLO, CH., GANLY, P., DARTIGEAS, C., ROSTA, A., JANSSENS, A., MILA, M., MAURER, J., WENGER, M. K. Rituximab, Fludarabine, and Cyclophosphamide (R-FC) Prolongs Progression Free Survival in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Compared with FC Alone: Final Results from the International Randomized Phase III REACH Trial.

- Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2008, vol. 112, no. 11, abstract 1. Print ISSN: 0006-4971. Online ISSN: 1528-0020.
150. SMOLEJ, L., BRYCHTOVÁ, Y., ŠPACEK, M., DOUBEK, M., BELADA, D., MOTYČKOVÁ, M., CMUNT, E., PROCHÁZKA, V., ROHOŇ, P., POUL, H., KLÁSKOVÁ, K., KOZÁK, T., GROUP, C. C. S. Low-Dose Fludarabine and Cyclophosphamide Combined With Rituximab Is a Safe and Effective Treatment Option for Elderly and Comorbid Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma: Preliminary Results of Project Q-lite, by the Czech CLL Study Group. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 2011, vol. 11, no. 2, s. 261.
151. FISCHER, K., STILGENBAUER, S., SCHWEIGHOFER, C., BUSCH, R., RENSCHLER, J., KIEHL, M., BALLEISEN, L., ECKART, M. J., FINK, AM., KILP, J., RITGEN, M., BÖETTCHER, S., KNEBA, M., DÖHNER, H., EICHHORST, B. F., HALLEK, M., WENDTNER, CM., The German CLL Study Group. Bendamustine in Combination with Rituximab (BR) for Patients with Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): A Multicentre Phase II Trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2008, vol. 112, no. 11, abstract 330. Print ISSN: 0006-4971. Online ISSN: 1528-0020.
152. FISCHER, K., CRAMER, P., STILGENBAUER, S., BUSCH, R., BALLEISEN, L., KILP, J., FINK, AM., BÖETTCHER, S., RITGEN, M., KNEBA, M., STAIB, P., DÖHNER, H., SCHULTE, S., EICHHORST, B. F., HALLEK, M., WENDTNER, CM., and the German CLL Study Group (GCLLSG). Bendamustine Combined with Rituximab (BR) in First-Line Therapy of Advanced CLL: A Multicenter Phase II Trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2009, vol. 114, no. 22, abstract 205. Print ISSN: 0006-4971. Online ISSN: 1528-0020.
153. KEATING, M. J., FLINN, I., JAIN, V., BINET, J. L., HILLMEN, P., BYRD, J., ALBITAR, M., BRETTMAN, L., SANTABARBARA, P., WACKER, B., RAI, K. R. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*, 2002, vol. 99, no. 10, s. 3554-3561.
154. SMOLEJ, L., PROCHÁZKA, V., ŠPACEK, M., OBRTLÍKOVÁ, P., GUMULEC, J., VOKURKA, S., DOUBEK, M. Doporučení pro léčbu alemtuzumabem u chronické lymfocytární leukemie (CLL). *Vnitř Lék*, 2012, vol. 58, no. 3, s. 232-236.

155. DREGER, P., CORRADINI, P., KIMBY, E., MICHALLET, M., MILLIGAN, D., SCHETELIG, J., WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W., NIEDERWIESER, D., HALLEK, M., MONTSERRAT, E. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*, 2007, vol. 21, no. 1, s. 12-17.
156. BOSCH, F., ABRISQUETA, P., VILLAMOR, N., TEROL, M. J., GONZALEZ-BARCA, E., FERRA, C., GONZALEZ DIAZ, M., ABELLA, E., DELGADO, J., CARBONELL, F., GARCIA MARCO, J. A., ESCODA, L., FERRER, S., MONZO, E., GONZALEZ, Y., ESTANY, C., JARQUE, I., SALAMERO, O., MUNTANOLA, A., MONTSERRAT, E. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2009, vol. 27, no. 27, s. 4578-4584.
157. DUNGARWALLA, M., EVANS, S. O., RILEY, U., CATOVSKY, D., DEARDEN, C. E., MATUTES, E. High dose methylprednisolone and rituximab is an effective therapy in advanced refractory chronic lymphocytic leukemia resistant to fludarabine therapy. *Haematologica*, 2008, vol. 93, no. 3, s. 475-476.
158. BOWEN, D. A., CALL, T. G., JENKINS, G. D., ZENT, C. S., SCHWAGER, S. M., VAN DYKE, D. L., JELINEK, D. F., KAY, N. E., SHANAFELT, T. D. Methylprednisolone-rituximab is an effective salvage therapy for patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia including those with unfavorable cytogenetic features. *Leuk Lymphoma*, 2007, vol. 48, no. 12, s. 2412-2417.
159. SMOLEJ, L., DOUBEK, M., PANOVSKA, A., SIMKOVIC, M., BRYCHTOVA, Y., BELADA, D., MOTYCKOVA, M., MAYER, J. Rituximab in combination with high-dose dexamethasone for the treatment of relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, 2012, vol. 36, no. 10, s. 1278-1282.
160. TEELING, J. L., FRENCH, R. R., CRAGG, M. S., VAN DEN BRAKEL, J., PLUYTER, M., HUANG, H., CHAN, C., PARREN, P. W., HACK, C. E., DECHANT, M., VALERIUS, T., VAN DE WINKEL, J. G., GLENNIE, M. J. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 6, s. 1793-1800.
161. OSTERBORG, A., KIPPS, T. J., MAYER, J., STILGENBAUER, S., WILLIAMS, C. D., HELLMEN, A., ROBAK, T., FURMAN, R. R., HILLMEN, T., TRNENY, M., DYER, M. J. S., SWAMINATHAN, P., KOZAK, T., CHAN, G., DAVIS, R. L., NEDJAD, L., RUSSELL, CH. A., PIOTROWSKA, M., WILMS, J., WIERDA, W. G.

- Ofatumumab (HuMax-CD20), a Novel CD20 Monoclonal Antibody, Is An Active Treatment for Patients with CLL Refractory to Both Fludarabine and Alemtuzumab or Bulky Fludarabine-Refractory Disease: Results from the Planned Interim Analysis of An International Pivotal Trial. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2008, vol. 112, no. 11, abstract 328. Print ISSN: 0006-4971. Online ISSN: 1528-0020.
162. WIERDA, W. G., KIPPS, T. J., DURIG, J., GRISKEVICIUS, L., STILGENBAUER, S., MAYER, J., SMOLEJ, L., HESS, G., GRINIUTE, R., HERNANDEZ-ILIZALITURRI, F. J., PADMANABHAN, S., GORCZYCA, M., CHANG, C. N., CHAN, G., GUPTA, I., NIELSEN, T. G., RUSSELL, C. A. Chemoimmunotherapy with O-FC in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 24, s. 6450-6458.
163. BYRD, J. C., KIPPS, T. J., FLINN, I. W., CASTRO, J., LIN, T. S., WIERDA, W., HEEREMA, N., WOODWORTH, J., HUGHES, S., TANGRI, S., HARRIS, S., WYNNE, D., MOLINA, A., LEIGH, B., O'BRIEN, S. Phase 1/2 study of lumiliximab combined with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2010, vol. 115, no. 3, s. 489-495.
164. AWAN, F. T., JOHNSON, A. J., LAPALOMBELLA, R., HU, W., LUCAS, M., FISCHER, B., BYRD, J. C. Thalidomide and lenalidomide as new therapeutics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2010, vol. 51, no. 1, s. 27-38.
165. GIANNOPOULOS, K., DMOSZYNSKA, A., KOWAL, M., WASIK-SZCZEPANEK, E., BOJARSKA-JUNAK, A., ROLINSKI, J., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S., BULLINGER, L. Thalidomide exerts distinct molecular antileukemic effects and combined thalidomide/fludarabine therapy is clinically effective in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2009, vol. 23, no. 10, s. 1771-1778.
166. CHANAN-KHAN, A., MILLER, K. C., TAKESHITA, K., KORYZNA, A., DONOHUE, K., BERNSTEIN, Z. P., MOHR, A., KLIPPENSTEIN, D., WALLACE, P., ZELDIS, J. B., BERGER, C., CZUCZMAN, M. S. Results of a phase 1 clinical trial of thalidomide in combination with fludarabine as initial therapy for patients with treatment-requiring chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*, 2005, vol. 106, no. 10, s. 3348-3352.

167. CHANAN-KHAN, A., MILLER, K. C., MUSIAL, L., LAWRENCE, D., PADMANABHAN, S., TAKESHITA, K., PORTER, C. W., GOODRICH, D. W., BERNSTEIN, Z. P., WALLACE, P., SPANER, D., MOHR, A., BYRNE, C., HERNANDEZ-ILIZALITURRI, F., CHRYSTAL, C., STAROSTIK, P., CZUCZMAN, M. S. Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J Clin Oncol*, 2006, vol. 24, no. 34, s. 5343-5349.
168. FERRAJOLI, A., LEE, B. N., SCHLETTE, E. J., O'BRIEN, S. M., GAO, H., WEN, S., WIERDA, W. G., ESTROV, Z., FADERL, S., COHEN, E. N., LI, C., REUBEN, J. M., KEATING, M. J. Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 11, s. 5291-5297.
169. SPINA, F., REZZONICO, F., FARINA, L., CORRADINI, P. Long-term molecular remission with lenalidomide treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*, 2013, vol. 90, no. 4, s. 340-344.
170. FADERL, S., RAI, K., GRIBBEN, J., BYRD, J. C., FLINN, I. W., O'BRIEN, S., SHENG, S., ESSELTINE, D. L., KEATING, M. J. Phase II study of single-agent bortezomib for the treatment of patients with fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2006, vol. 107, no. 5, s. 916-924.
171. HALLEK, M., PFLUG, N. State of the art treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Rev*, 2011, vol. 25, no. 1, s. 1-9.
172. ROBAK, T., DMOSZYNSKA, A., SOLAL-CELIGNY, P., WARZOCHA, K., LOSCERTALES, J., CATALANO, J., AFANASIEV, B. V., LARRATT, L., GEISLER, C. H., MONTILLO, M., ZYUZGIN, I., GANLY, P. S., DARTIGEAS, C., ROSTA, A., MAURER, J., MENDILA, M., SAVILLE, M. W., VALENTE, N., WENGER, M. K., MOISEEV, S. I. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2010, vol. 28, no. 10, s. 1756-1765.
173. LIU, Z., HAZAN-HALEVY, I., HARRIS, D. M., LI, P., FERRAJOLI, A., FADERL, S., KEATING, M. J., ESTROV, Z. STAT-3 activates NF-kappaB in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Cancer Res*, 2011, vol. 9, no. 4, s. 507-515.
174. BONIZZI, G., KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 2004, vol. 25, no. 6, s. 280-288.

175. DE MARTIN, R., SCHMID, J. A., HOFER-WARBINEK, R. The NF-kappaB/Rel family of transcription factors in oncogenic transformation and apoptosis. *Mutat Res*, 1999, vol. 437, no. 3, s. 231-243.
176. HAIAT, S., BILLARD, C., QUINEY, C., AJCHENBAUM-CYMBALISTA, F., KOLB, J. P. Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 2006, vol. 118, no. 3, s. 281-292.
177. MEINHARDT, G., WENDTNER, C. M., HALLEK, M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med (Berl)*, 1999, vol. 77, no. 2, s. 282-293.
178. ZANINONI, A., IMPERIALI, F. G., PASQUINI, C., ZANELLA, A., BARCELLINI, W. Cytokine modulation of nuclear factor-kappaB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*, 2003, vol. 31, no. 3, s. 185-190.
179. FUCHS, O. Transcription factor NF-kappaB inhibitors as single therapeutic agents or in combination with classical chemotherapeutic agents for the treatment of hematologic malignancies. *Curr Mol Pharmacol*, 2010, vol. 3, no. 3, s. 98-122.
180. VON BERGWELT-BAILDON, M., MAECKER, B., SCHULTZE, J., GRIBBEN, J. G. CD40 activation: potential for specific immunotherapy in B-CLL. *Ann Oncol*, 2004, vol. 15, no. 6, s. 853-857.
181. ROBAK, T. Emerging monoclonal antibodies and related agents for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncol*, 2013, vol. 9, no. 1, s. 69-91.
182. BYRD, J. C., KIPPS, T. J., FLINN, I. W., COOPER, M., ODENIKE, O., BENDISKE, J., REDISKE, J., BILIC, S., DEY, J., BAECK, J., O'BRIEN, S. Phase I study of the anti-CD40 humanized monoclonal antibody lucatumumab (HCD122) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2012, vol. 53, no. 11, s. 2136-2142.
183. DECKER, T., BOGNER, C., OELSNER, M., PESCHEL, C., RINGSHAUSEN, I. Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors. *Ann Hematol*, 2010, vol. 89, no. 11, s. 1125-1132.
184. PODHORECKA, M. Apoptosis in pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2004, vol. 58, s. 236-242.
185. TRENTIN, L., ZAMBELLO, R., AGOSTINI, C., ENTHAMMER, C., CERUTTI, A., ADAMI, F., ZAMBONI, S., SEMENZATO, G. Expression and regulation of tumor necrosis factor, interleukin-2, and hematopoietic growth factor receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1994, vol. 84, no. 12, s. 4249-4256.

186. DOUGLAS, R. S., CAPOCASALE, R. J., LAMB, R. J., NOWELL, P. C., MOORE, J. S. Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. *Blood*, 1997, vol. 89, no. 3, s. 941-947.
187. STEELE, A. J., PRENTICE, A. G., CWYNARSKI, K., HOFFBRAND, A. V., HART, S. M., LOWDELL, M. W., SAMUEL, E. R., WICKREMASINGHE, R. G. The JAK3-selective inhibitor PF-956980 reverses the resistance to cytotoxic agents induced by interleukin-4 treatment of chronic lymphocytic leukemia cells: potential for reversal of cytoprotection by the microenvironment. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 22, s. 4569-4577.
188. SAMY, N., ABD EL-MAKSoud, M. D., MOUSA, T. E., EL-MEZAYEN, H. A., SHAALAN, M. Potential role of serum level of soluble CD44 and IFN-gamma in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*, 2011, vol. 28, no. 1, s. 471-475.
189. PODHORECKA, M., DMOSZYNSKA, A., ROLINSKI, J. Intracellular IFN-gamma expression by CD3+/CD8+ cell subset in B-CLL patients correlates with stage of the disease. *Eur J Haematol*, 2004, vol. 73, no. 1, s. 29-35.
190. GALLEGO, A., VARGAS, J. A., CASTEJON, R., CITORES, M. J., ROMERO, Y., MILLAN, I., DURANTEZ, A. Production of intracellular IL-2, TNF-alpha, and IFN-gamma by T cells in B-CLL. *Cytometry B Clin Cytom*, 2003, vol. 56, no. 1, s. 23-29.
191. GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK, O., CEBULA, B., ROBAK, T., SMOLEWSKI, P. Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer*, 2010, vol. 46, no. 4, s. 800-810.
192. LOEDER, S., ZENZ, T., SCHNAITER, A., MERTENS, D., WINKLER, D., DÖHNER, H., DEBATIN, K. M., STILGENBAUER, S., FULDA, S. A novel paradigm to trigger apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, 2009, vol. 69, no. 23, s. 8977-8986.
193. KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus, 2004. 968 s. ISBN 80-86225-50-X. Kapitola 34, Modulace imunitního systému, s. 775-820.
194. HORIUCHI, T., MITOMA, H., HARASHIMA, S., TSUKAMOTO, H., SHIMODA, T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, vol. 49, no. 7, s. 1215-1228.
195. TRENTIN, L., ZAMBELLO, R., AGOSTINI, C., SIVIERO, F., ADAMI, F., MARCOLONGO, R., RAIMONDI, R., CHISESI, T., PIZZOLO, G., SEMENZATO,

- G. Expression and functional role of tumor necrosis factor receptors on leukemic cells from patients with type B chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*, 1993, vol. 81, no. 3, s. 752-758.
196. KAST, R. E., ALTSCHULER, E. L. Anti-apoptosis function of TNF-alpha in chronic lymphocytic leukemia: lessons from Crohn's disease and the therapeutic potential of bupropion to lower TNF-alpha. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005, vol. 53, no. 2, s. 143-147.
197. ROSATI, E., SABATINI, R., TABILIO, A., DI IANNI, M., BARTOLI, A., MARCONI, P. B-chronic lymphocytic leukemia cells exert an in vitro cytotoxicity mediated by tumor necrosis factor alpha. *Leuk Res*, 2005, vol. 29, no. 7, s. 829-839.
198. DIGEL, W., PORZSOLT, F., SCHMID, M., HERRMANN, F., LESSLAUER, W., BROCKHAUS, M. High levels of circulating soluble receptors for tumor necrosis factor in hairy cell leukemia and type B chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*, 1992, vol. 89, no. 5, s. 1690-1693.
199. YAN, X. J., DOZMOROV, I., LI, W., YANCOPOULOS, S., SISON, C., CENTOLA, M., JAIN, P., ALLEN, S. L., KOLITZ, J. E., RAI, K. R., CHIORAZZI, N., SHERRY, B. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 19, s. 5201-5210.
200. ADAMI, F., GUARINI, A., PINI, M., SIVIERO, F., SANCETTA, R., MASSAIA, M., TRENTIN, L., FOA, R., SEMENZATO, G. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer*, 1994, vol. 30A, no. 9, s. 1259-1263.
201. WAAGE, A., ESPEVIK, T. TNF receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 1994, vol. 13, no. 1-2, s. 41-46.
202. REITTIE, J. E., YONG, K. L., PANAYIOTIDIS, P., HOFFBRAND, A. V. Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*, 1996, vol. 22, no. 1-2, s. 83-90, follow 186, color plate VI.
203. TSOPRA, O. A., ZIROS, P. G., LAGADINO, E. D., SYMEONIDIS, A., KOURAKLIS-SYMEONIDIS, A., THANOPOULOU, E., ANGELOPOULOU, M. K., VASSILAKOPOULOS, T. P., PANGALIS, G. A., ZOUMBOS, N. C. Disease-related anemia in chronic lymphocytic leukemia is not due to intrinsic defects of erythroid precursors: a possible pathogenetic role for tumor necrosis factor-alpha. *Acta Haematol*, 2009, vol. 121, no. 4, s. 187-195.

204. BOJARSKA-JUNAK, A., HUS, I., SZCZEPANEK, E. W., DMOSZYNSKA, A., ROLINSKI, J. Peripheral blood and bone marrow TNF and TNF receptors in early and advanced stages of B-CLL in correlation with ZAP-70 protein and CD38 antigen. *Leuk Res*, 2008, vol. 32, no. 2, s. 225-233.
205. SINGER, M. K., ASSEM, M., ABDEL GHAFAR, A. B., MORCOS, N. Y. Role of TNF-alpha as a survival prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia patients. *Egypt J Immunol*, 2011, vol. 18, no. 1, s. 51-60.
206. LECH-MARANDA, E., GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK, O., WYKA, K., MLYNARSKI, W., BOROWIEC, M., ANTOSIK, K., CEBULA-OBZUT, B., MAKUCH-LASICA, H., NOWAK, G., KLIMKIEWICZ-WOJCIECHOWSKA, G., WAWRZYNIAK, E., BILINSKI, P., ROBAK, T., WARZOCHA, K. Serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 levels as markers to predict outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia in different risk groups defined by the IGHV mutation status. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, vol. 60, no. 6, s. 477-486.
207. HUANG, S. S., HUANG, J. S. TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem*, 2005, vol. 96, no. 3, s. 447-462.
208. BUSKE, C., BECKER, D., FEURING-BUSKE, M., HANNIG, H., GRIESINGER, F., HIDDEMANN, W., WORMANN, B. TGF-beta and its receptor complex in leukemic B-cell precursors. *Exp Hematol*, 1998, vol. 26, no. 12, s. 1155-1161.
209. ROMANO, S., MALLARDO, M., CHIURAZZI, F., BISOGNI, R., D'ANGELILLO, A., LIUZZI, R., COMPARE, G., ROMANO, M. F. The effect of FK506 on transforming growth factor beta signaling and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica*, 2008, vol. 93, no. 7, s. 1039-1048.
210. MEULMEESTER, E., TEN DIJKE, P. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J Pathol*, 2011, vol. 223, no. 2, s. 205-218.
211. DECOTEAU, J. F., KNAUS, P. I., YANKELEV, H., REIS, M. D., LOWSKY, R., LODISH, H. F., KADIN, M. E. Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, vol. 94, no. 11, s. 5877-5881.
212. KREMER, J. P., REISBACH, G., NERL, C., DORMER, P. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells express and release transforming growth factor-beta. *Br J Haematol*, 1992, vol. 80, no. 4, s. 480-487.

213. SCHULER, M., TRETTER, T., SCHNELLER, F., HUBER, C., PESCHEL, C. Autocrine transforming growth factor-beta from chronic lymphocytic leukemia-B cells interferes with proliferative T cell signals. *Immunobiology*, 1999, vol. 200, no. 1, s. 128-139.
214. LAGNEAUX, L., DELFORGE, A., BRON, D., MASSY, M., BERNIER, M., STRYCKMANS, P. Heterogenous response of B lymphocytes to transforming growth factor-beta in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with the expression of TGF-beta receptors. *Br J Haematol*, 1997, vol. 97, no. 3, s. 612-620.
215. LOTZ, M., RANHEIM, E., KIPPS, T. J. Transforming growth factor beta as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med*, 1994, vol. 179, no. 3, s. 999-1004.
216. LAGNEAUX, L., DELFORGE, A., DORVAL, C., BRON, D., STRYCKMANS, P. Excessive production of transforming growth factor-beta by bone marrow stromal cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia inhibits growth of hematopoietic precursors and interleukin-6 production. *Blood*, 1993, vol. 82, no. 8, s. 2379-2385.
217. HO, C. L., PHYLIKY, R. L., LI, C. Y. B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation of clinical stages with angiogenic cytokine expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2006, vol. 14, no. 2, s. 154-160.
218. LAGNEAUX, L., DELFORGE, A., BERNIER, M., STRYCKMANS, P., BRON, D. TGF-beta activity and expression of its receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 1998, vol. 31, no. 1-2, s. 99-106.
219. SCHIEMANN, W. P., ROTZER, D., PFEIFER, W. M., LEVI, E., RAI, K. R., KNAUS, P., KADIN, M. E. Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-resistant B cells from chronic lymphocytic leukemia patients contain recurrent mutations in the signal sequence of the type I TGF-beta receptor. *Cancer Detect Prev*, 2004, vol. 28, no. 1, s. 57-64.
220. CHLEBOVA, K., BRYJA, V., DVORAK, P., KOZUBIK, A., WILCOX, W. R., KREJCI, P. High molecular weight FGF2: the biology of a nuclear growth factor. *Cell Mol Life Sci*, 2009, vol. 66, no. 2, s. 225-235.
221. GOSPODAROWICZ, D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem*, 1975, vol. 250, no. 7, s. 2515-2520.
222. ALLOUCHE, M., BIKFALVI, A. The role of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in hematopoiesis. *Prog Growth Factor Res*, 1995, vol. 6, no. 1, s. 35-48.

223. PADERA, R., VENKATARAMAN, G., BERRY, D., GODAVARTI, R., SASISEKHARAN, R. FGF-2/fibroblast growth factor receptor/heparin-like glycosaminoglycan interactions: a compensation model for FGF-2 signaling. *FASEB J*, 1999, vol. 13, no. 13, s. 1677-1687.
224. ALLOUCHE, M., BAYARD, F., CLAMENS, S., FILLOLA, G., SIE, P., AMALRIC, F. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and FGF-receptors in human leukemic cells. *Leukemia*, 1995, vol. 9, no. 1, s. 77-86.
225. SHANAFELT, T. D., GEYER, S. M., BONE, N. D., SCHWAGER, S., LEE, Y. K., NOWAKOWSKI, G., CALL, T. G., ZENT, C. S., KAY, N. E. Evaluation of the prognostic implications of pro- and anti-angiogenic cytokines in 311 patients with untreated chronic lymphocytic leukemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2005, vol. 106, no. 11, abstract 712. Print ISSN: 0006-4971. Online ISSN: 1528-0020.
226. SMOLEJ, L., ANDRYS, C., PEKOVA, S., SCHWARZ, J., BELADA, D., ZAK, P. Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 2006, vol. 91, no. 10, s. 1432-1433.
227. SMOLEJ, L., ANDRYS, C., VROBLOVA, V. Modern prognostic factors and angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia: more data needed. *Leuk Res*, 2007, vol. 31, no. 12, s. 1763-1764.
228. KREJCI, P., FAITOVA, J., LAURELL, H., HAMPL, A., DVORAK, P. FGF-2 expression and its action in human leukemia and lymphoma cell lines. *Leukemia*, 2003, vol. 17, no. 4, s. 818-820.
229. ARMSTRONG, E., VAINIKKA, S., PARTANEN, J., KORHONEN, J., ALITALO, R. Expression of fibroblast growth factor receptors in human leukemia cells. *Cancer Res*, 1992, vol. 52, no. 7, s. 2004-2007.
230. KÖNIG, A., MENZEL, T., LYNEN, S., WRAZEL, L., ROSEN, A., AL-KATIB, A., RAVECHE, E., GABRILOVE, J. L. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia*, 1997, vol. 11, no. 2, s. 258-265.
231. MENZEL, T., RAHMAN, Z., CALLEJA, E., WHITE, K., WILSON, E. L., WIEDER, R., GABRILOVE, J. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood*, 1996, vol. 87, no. 3, s. 1056-1063.

232. ROMANOV, V. V., JAMES, C. H., SHERRINGTON, P. D., PETTITT, A. R. Basic fibroblast growth factor suppresses p53 activation in the neoplastic cells of a proportion of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene*, 2005, vol. 24, no. 45, s. 6855-6860.
233. GABRILOVE, J. L. Angiogenic growth factors: autocrine and paracrine regulation of survival in hematologic malignancies. *Oncologist*, 2001, vol. 6, no. 5, s. 4-7.
234. HERTLEIN, E., WAGNER, A. J., JONES, J., LIN, T. S., MADDOCKS, K. J., TOWNS, W. H., 3RD, GOETTL, V. M., ZHANG, X., JARJOURA, D., RAYMOND, C. A., WEST, D. A., CROCE, C. M., BYRD, J. C., JOHNSON, A. J. 17-DMAG targets the nuclear factor-kappaB family of proteins to induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia: clinical implications of HSP90 inhibition. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 1, s. 45-53.
235. BHALLA, S., BALASUBRAMANIAN, S., DAVID, K., SIRISAWAD, M., BUGGY, J., MAURO, L., PRACHAND, S., MILLER, R., GORDON, L. I., EVENS, A. M. PCI-24781 induces caspase and reactive oxygen species-dependent apoptosis through NF-kappaB mechanisms and is synergistic with bortezomib in lymphoma cells. *Clin Cancer Res*, 2009, vol. 15, no. 10, s. 3354-3365.
236. WOYACH, J. A., LIN, T. S., LUCAS, M. S., HEEREMA, N., MORAN, M. E., CHENEY, C., LUCAS, D. M., WEI, L., CALIGIURI, M. A., BYRD, J. C. A phase I/II study of rituximab and etanercept in patients with chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Leukemia*, 2009, vol. 23, no. 5, s. 912-918.
237. BALATO, A., LEMBO, S., CIRILLO, T., MEGNA, M., RAIMONDO, A., DI COSTANZO, L. Anti-Tumor Necrosis Factor-alpha Therapy in the Management of Psoriasis and B-Chronic Lymphocytic Leukemia. *Case Rep Dermatol*, 2011, vol. 3, no. 1, s. 60-63.

11. Přehled obrazové dokumentace a tabulek

11.1 Tabulky

Tab. 1. Diagnostická kritéria CLL dle National Cancer Institute-Sponsored Working Group.

Tab. 2. Staging CLL podle Raie.

Tab. 3. Staging CLL podle Bineta.

Tab. 4. Celkové přežití nemocných s CLL v závislosti na cytogenetických aberacích.

Tab. 5. Kritéria progredující/aktivní choroby.

Tab. 6. Deskriptivní charakteristiky nemocných.

Tab. 7. Přehled nejdůležitějších nálezů v našem souboru – deskriptivní statistika.

Tab. 8. Přehled nejdůležitějších studií, u nichž byly prokázány zvýšené plazmatické/sérové koncentrace FGF-2 a jejich souvislost s prognostickými ukazateli.

11.2 Grafy

Graf 1. Období do zahájení léčby (celý soubor).

Graf 2. Celkové přežití celého souboru nemocných.

Graf 3. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 4. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání se středním i nízkým rizikem. Sérové koncentrace TNF- α se neliší mezi skupinou s nízkým a středním rizikem dle Raie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 5. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných se zvýšeným sérovým B2M. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 6. Sérové koncentrace TNF- α slabě pozitivně korelují s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi (ALC). Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 7. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s masivní lymfadenopatií. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 8. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s nemutovanými IgVH geny. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 9. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s nepříznivými cytogenetickými aberacemi. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 10. Nemocní s progresí CLL mají statisticky významně vyšší sérové koncentrace TNF- α než nemocní se stabilním onemocněním. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 11. Období do zahájení léčby je významně kratší u nemocných se sérovými koncentracemi TNF- α vyššími než medián (2,83 pg/ml).

Graf 12. Sérové koncentrace TGF- β 1 nejsou významně rozdílné u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 13. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných s nízkým rizikem dle Raie v porovnání s vysokým rizikem. Sérové koncentrace TGF- β 1 se neliší mezi skupinami s nízkým a středním rizikem ani mezi skupinami se středním a vysokým rizikem dle Raie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 14. Sérové koncentrace TGF- β 1 slabě negativně korelují s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi (ALC). Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 15. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných bez masivní lymfadenopatie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 16. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných s mutovanými IgVH geny. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 17. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných se ZAP-70 negativitou. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 18. Nemocní s progresí CLL mají statisticky významně nižší sérové koncentrace TGF- β 1 než nemocní se stabilním onemocněním. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 19. Období do zahájení léčby je významně delší u nemocných se sérovými koncentracemi TGF- β 1 vyššími než medián (44280 pg/ml).

Graf 20. Expresa TGF β R2 není významně rozdílná u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou. Expresa je uvedena v procentech (%).

Graf 21. Statisticky významně nižší exprese TGF β R2 u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým rizikem. Expresa TGF β R2 se neliší mezi skupinami s nízkým a středním rizikem ani mezi skupinami se středním a vysokým rizikem dle Raie. Expresa je uvedena v procentech (%).

Graf 22. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací FGF-2 u nemocných s CLL v porovnání s kontrolami. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 23. Nemocní se středním rizikem dle Raie mají statisticky významně vyšší sérové koncentrace FGF-2 než nemocní s nízkým i vysokým rizikem. Sérové koncentrace FGF-2 se neliší mezi skupinou s nízkým a vysokým rizikem dle Raie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 24. Sérové koncentrace FGF-2 pozitivně korelují s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi (ALC). Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Graf 25. Exprese FGFR2 je statisticky významně vyšší v kontrolní skupině v porovnání s nemocnými s CLL. Exprese je uvedena v procentech (%).

Graf 26. Statisticky významně vyšší exprese FGFR2 u nemocných s normální sérovou LDH. Exprese je uvedena v procentech (%).

Graf 27. Statisticky významně vyšší exprese FGFR2 u nemocných s normálním sérovým B2M. Exprese je uvedena v procentech (%).

Graf 28. Exprese FGFR2 slabě negativně koreluje s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi (ALC). Exprese je uvedena v procentech (%).

11.3 Obrázky

Obr. 1. Role mikroprostředí u CLL.

Obr. 2. Komplexní hodnocení prognózy nemocných s CLL.

Obr. 3. Pro-apoptické a anti-apoptické působení TNF- α .

Obr. 4. Signalizační dráha TGF- β .

12. Přílohy

12.1 Summary

Introduction: Search for new prognostic markers in order to improve prognostic accuracy and predict clinical outcome at the time of diagnosis has recently become one of the major trends in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Aims of the project:* Assessment of selected markers of apoptosis and angiogenesis and their potential as new prognostic factors and correlation with conventional and modern prognostic factors and clinical course. *Patients and Methods:* We evaluated serum levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay; furthermore, we quantified expression of type II receptor for transforming growth factor beta (TGF β RII) and type 2 receptor for FGF-2 (FGFR2) on CLL cells using flow cytometry analysis in 75 previously untreated patients with CLL (47 males and 28 females, median age, 65 years, range, 38-82) and healthy donors. *Results:* We found significantly elevated TNF- α in patients with CLL compared to the control group ($p < 0.0001$); high expression of TNF- α was associated with unfavourable prognosis: significantly higher TNF- α was present in patients with Rai high-risk group compared to low- and intermediate-risk groups ($p = 0.0008$ and $p = 0.0097$), with high serum beta 2-microglobulin ($p = 0.045$), massive lymphadenopathy ($p = 0.0083$), unmutated genes for variable region of immunoglobulin heavy chain (IgVH) ($p = 0.041$) and unfavourable cytogenetic aberrations ($p = 0.0014$). In addition, patients with progressive CLL had significantly higher TNF- α than those with stable clinical course ($p = 0.0009$); time to treatment (TTT) was significantly shorter in patients with higher TNF- α ($p = 0.0049$). Higher TGF- β 1 concentrations were associated with favourable prognosis, i.e. with Rai low-risk group compared to high-risk group ($p = 0.011$), patients without massive lymphadenopathy ($p = 0.041$), patients with mutated IgVH ($p = 0.012$) and ZAP-70 negativity (zeta-associated protein of 70 kilodaltons) ($p = 0.044$). Patients with progressive CLL had significantly lower TGF- β 1 levels than those with stable course ($p = 0.0014$) and TTT was significantly longer in patients with higher TGF- β 1 ($p = 0.016$). Patients with Rai high-risk group had significantly lower TGF β RII expression than those with low-risk group ($p = 0.022$). Serum concentrations of FGF-2 were significantly higher in patients with CLL compared to the control group ($p < 0.0001$). FGFR2 expression was significantly lower in CLL compared to the control group ($p = 0.042$). The prognostic significance of FGF-2 and FGFR2 was not found. Significant and

independent prognostic factors for overall survival were high serum concentrations of TNF- α and massive lymphadenopathy (evaluated by ultrasound) ($p = 0.036$ and $p = 0.047$). *Conclusions:* Based on our results, TNF- α and TGF- β 1 possess prognostic significance in CLL; further research in this direction may also be important therapeutically, because these signal pathways could serve as possible treatment targets. Low TGF β RII expression in advanced stages could contribute to resistance to anti-proliferative effect of TGF- β and worse prognosis. Massive lymphadenopathy proved to be a negative prognostic feature; therefore detection by ultrasound could be useful in daily clinical practice.