

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

**PROGNOSTICKÝ VÝZNAM ATYPICKÉ
MORFOLOGIE LEUKEMICKÝCH BUNĚK U
CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE**

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. MUDr. Lukáš Smolej, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Autor práce: Bc. Nikola Fučíková

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce, doc. MUDr. Lukáši Smoleji, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a pomoc v průběhu vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Vladimíře Daňové a laborantkám z laboratoře IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, které mi předaly své morfologické zkušenosti.

Abstrakt

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Zdravotnická bionalytika

Kandidát: Bc. Nikola Fučíková

Vedoucí: doc. MUDr. Lukáš Smolej, Ph.D.

Název diplomové práce: Prognostický význam atypické morfologie leukemických buněk u chronické lymfocytární leukémie

Cílem této diplomové práce je posoudit prognostický význam atypické morfologie buněk a jaderných stínů u nemocných s neléčenou chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Provedli jsme diferenciální rozpočet leukocytů a rozřazení lymfocytů na typické a atypické v kohortě 101 pacientů (medián věku 66 let, 69 % mužů, stádium Rai III/IV v 18 %). Pro atypickou CLL (aCLL) jsme nastavili hranici 15 %, zjištěna byla u 59 % pacientů. Pro pozitivitu jaderných stínů (JS) jsme zvolili hranici 30 %; 33 % nemocných mělo zvýšené JS. Nezjistili jsme významnou spojitost aCLL/ jaderných stínů s moderními prognostickými ukazateli. Z hlediska jaderných stínů jsme prokázali souvislost vyššího zastoupení JS a časného klinického stádia dle Raie ($p=0,04$). Nebyl zjištěn vztah mezi aCLL a obdobím do léčby 1. linie ($p=0,394$); nemocní s aCLL však měli významně kratší celkové přežití ($p=0,0397$). U nemocných s nižším počtem jaderných stínů byl přítomen určitý trend ke kratšímu období do léčby 1. linie ($p=0,22$) a kratšímu celkovému přežití ($p=0,16$). Výsledky předkládané práce podporují hypotézu o nepříznivém prognostickém vlivu atypické morfologie a nižšího zastoupení jaderných stínů u chronické lymfocytární leukémie.

Klíčová slova: morfologie, periferní krev, chronická lymfocytární leukémie, prognóza

Abstract

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Health Care Bioanalytics

Candidate: Bc. Nikola Fučíková

Supervisor: doc. MUDr. Lukáš Smolej, Ph.D.

Title of diploma thesis: Prognostic significance of atypical leukemic cell morphology in chronic lymphocytic leukemia

The aim of this thesis is to evaluate the prognostic significance of atypical cell morphology and smudge cells in patients with untreated chronic lymphocytic leukemia. We performed differential leukocytes count and classified lymphocytes as typical and atypical in a cohort of 101 patients (median age, 66 years; males, 69%, Rai III/IV stages, 18%). For atypical CLL, we used the 15% threshold and 59% of patients were classified as atypical CLL (aCLL). For smudge cells, we chose the 30% threshold and 33% of patients were classified as smudge cells positive. Patients in early clinical Rai stage (0) had significantly higher number of smudge cells ($p=0.04$). We didn't find a significant association between aCLL / smudge cells with modern prognostic indicators. We didn't find a relationship between aCLL and the time to first-line therapy ($p=0.394$). However, patients with aCLL had a significantly shorter overall survival ($p=0.0397$). There was a trend toward shorter time to first-line therapy ($p=0.22$) and shorter overall survival ($p=0.16$) of patients with fewer smudge cells. The results of the present thesis support the adverse prognostic impact of atypical morphology and a lower number of smudge cells in chronic lymphocytic leukemia.

Key words: morphology, peripheral blood, chronic lymphocytic leukemia, prognosis

Seznam zkratek

aCLL	atypická chronická lymfocytární leukémie
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
CFU	Colony Forming Unit
CFU-E	Colony Forming Unit-Erythroid
CI	interval spolehlivosti (confidence interval)
CLL/PL	chronická lymfocytární leukémie/ prolymfocytární leukémie
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
FAB	French-American-British classification
FASAY	funkční test pro analýzu genu p53 (functional analysis of separated alleles in yeast)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
Hb	hemoglobin
HR	index rizika (hazard ratio)
IgV_H	variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu
IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
JS	jaderné stíny
K₃EDTA	trojdraselná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové
LAK buňky	lymfokiny aktivovaní zabíječi (lymphokine activated killer cells)
LDH	laktátdehydrogenáza
LDT	zdvojovací čas lymfocytů (lymphocyte doubling time)
LIS	laboratorní informační systém
MRN	minimální reziduální nemoc
NK- buňky	natural killer cells
NIS	nemocniční informační systém
OS	celkové přežití (Overall Survival)

PubMed	volně dostupná databáze (Public MEDLINE)
ROC	analýza Receiver Operating Characteristics
SOP	standardní operační postup
tCLL	typická chronická lymfocytární leukémie
TGF β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
TTF	čas do léčby 1. linie (Time to First-line therapy)
ZAP-70	zeta- asociovaný protein o molekulární hmotnosti 70kDa

Obsah

1	Úvod	10
2	Zadání diplomové práce, cíle práce a hypotézy	12
3	Teoretická část.....	13
3.1	Milníky v historii CLL	13
3.2	Chronická lymfocytární leukémie.....	14
3.2.1	Etiologie.....	14
3.2.2	Epidemiologie	14
3.2.3	Klinický obraz a průběh nemoci	15
3.2.3.1	Anémie	15
3.2.3.2	Trombocytopenie.....	16
3.2.3.3	Imunosuprese.....	16
3.2.3.4	Výskyt monoklonálního imunoglobulinu.....	17
3.2.3.5	Zvýšená viskozita krve	17
3.2.3.6	Transformace choroby.....	17
3.2.4	Diagnostická kritéria CLL na základě diferenciálního krevního obrazu ..	17
3.2.5	Stanovení diagnózy CLL na základě imunofenotypizace.....	18
3.2.6	Prognostické faktory chronické lymfocytární leukémie.....	19
3.2.6.1	Klasické prognostické faktory	20
3.2.6.2	Nové prognostické faktory CLL.....	23
3.2.6.3	Cytogenetika a molekulární cytogenetika	23
3.2.7	Cytomorfologické nálezy u CLL	27
3.2.8	Léčba.....	28
3.2.8.1	Indikace k zahájení léčby	28
3.2.8.2	Léčebné možnosti u CLL	30
3.3	Vývoj lymfocytu	31
3.4	Laboratorní vyšetření morfologie buněk CLL	32
3.4.1	Preanalytická fáze	32
3.4.2	Zhotovení krevního nátěru.....	33
3.4.3	Barvení krevního nátěru.....	33
3.4.4	Zhodnocení krevního nátěru	34
4	Metodiky.....	35
4.1	Příprava nátěrů periferní krve	35

4.1.1	Zhotovení nátěru periferní krve	35
4.1.2	Manuální barvení krevních nátěrů	36
4.2	Hodnocení nátěrů periferní krve	37
4.3	Fotodokumentace buněk	38
5	Statistické zhodnocení výsledků.....	40
6	Výsledky.....	41
6.1	Charakteristika souboru pacientů	41
6.2	Stanovení mikroskopického rozpočtu leukocytů a zařazení lymfocytů	44
6.3	Stanovení hraniční (cut-off) hodnoty pro aCLL a jaderné stíny	44
6.4	Porovnání prognostických markerů.....	49
7	Diskuze	54
8	Závěr.....	59
9	Seznam tabulek.....	60
10	Seznam obrázků	60
11	Seznam grafů	61
12	Seznam použité literatury	61

1 Úvod

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je lymfoproliferativní onemocnění a nejběžnější leukémie dospělých v západním světě. CLL je charakterizována klonální expanzí nízcí proliferace vyvrálených B-buněk v periferní krvi a kostní dřeni, které pronikají do lymfatických uzlin a sleziny. (Cheson,1993)

Jako základní prognostický faktor slouží určení klinického stádia. Klinické stádium se stanoví na základě kritérií definované dle Raie nebo dle Bineta. Určení klinického stádia je jedním ze základních konvenčních faktorů, které se podílejí na rozhodnutí léčebného postupu.

Konvenční prognostické faktory jsou nedílnou součástí každodenní praxe při rozhodování individuální prognózy a terapie pacienta. V poslední době jsou doplňovány řadou nových biologických markerů. U některých prognostických markerů dochází v průběhu léčby ke změnám a vývoji např. k zesílení exprese. Jako velmi stabilní prognostický marker během celého klinického průběhu se ukazuje mutační stav genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgV_H).

Rozvoj laboratorních diagnostických metod umožňuje stanovit diagnózu CLL u většiny pacientů v časném stádiu nemoci. Cílem studia nových prognostických faktorů je u těchto pacientů určit, zda jejich průběh nemoci bude indolentní či povede k rychlé progresi. Takovéto zjištění by vedlo k včasnému nasazení individuální léčby a prodloužení života pacienta.

V současné době probíhá řada výzkumů nových prognostických markerů na molekulární úrovni. Sofistikované metody umožňují pochopit molekulární mechanismy během patogeneze nemoci, odhalit nové mutace genů související s CLL nebo prozkoumat vliv angiogeneze na patogenezi CLL. Mezi tyto metody patří např. polymerázová řetězová reakce v reálném čase, sekvenování nové generace a další metody. Řada těchto stanovení je však náročná a finančně nákladná, což je činní pro některé laboratoře nedostupné. Je důležité se zaměřit i na takové prognostické markery, které by se daly jednoduše stanovit a interpretovat za nízké pořizovací náklady. Jedním z takovýchto markerů může být využití prognostického významu atypické morfologie leukemických buněk u CLL.

Cílem této práce je zjistit prognostický význam atypické morfologie leukemických buněk u CLL. Už v roce 1999 Arnold Criel a kol. prezentovali hypotézu, že typická a atypická CLL představuje dvě úzce související, ale přesto odlišné entity charakterizované rozdílnou morfologií, prognostickými faktory, klinickým průběhem a rozdílnou dobou přežití. (Criel a kol., 1999) Vliv morfologické variability lymfocytů na prognózu CLL je však v dnešní době přijímán kontroverzně.

Dalším cílem této práce je posoudit prognostický význam jaderných stínů u CLL. Počet jaderných stínů je v poslední době vztahován k prognóze onemocnění.

2 Zadání diplomové práce, cíle práce a hypotézy

Zadání diplomové práce: Prognostický význam atypické morfologie leukemických buněk u chronické lymfocytární leukémie

Cíle práce:

- 1) Sestavit soubor nátěrů periferní krve pacientů s chronickou lymfocytární leukémií v době diagnózy.
- 2) Provést mikroskopický rozpočet nátěrů periferní krve s CLL a rozdělit lymfocyty na typické a atypické.
- 3) Posoudit vhodnou hraniční (cut-off) hodnotu pro atypickou CLL a pro jaderné stíny.
- 4) Zhodnotit prognostický význam aCLL a jaderných stínů u CLL.
- 5) Porovnat aCLL a jaderné stíny s ostatními prognostickými markery.

Hypotézy:

- 1) Atypická CLL bude souviset s pokročilým klinickým stádiem nemoci.
- 2) Atypická CLL bude korelovat s nepříznivými prognostickými markery a s nemutovanými IgV_H genem.
- 3) Atypická CLL bude spojena s progresí nemoci.
- 4) Atypická CLL povede ke kratšímu celkovému přežití.
- 5) Pacienti s ≥ 30 % jaderných stínů se budou vyskytovat v časném klinickém stádiu.
- 6) Pacienti s ≥ 30 % jaderných stínů budou mít delší dobu celkového přežití.

3 Teoretická část

3.1 Milníky v historii CLL

První doložené popisy leukémií a pojem leukémie jako takový pocházejí od lékařů Rudolfa Virchowa a Johna Hughese Benneta. (Bennett, 1845) Chronická lymfocytární leukémie byla popsána až na počátku 20. století. Zmíněna je v knize *The Principles and Practise of Medicine* lékařem Williamem Oslerem, jenž uvádí, že CLL v jeho souboru nemocných tvoří 22 % všech leukémií s dožitím 3 až 11 let. Roku 1924 přináší detailnější popis CLL George Minot a Raphael Isaacse. (Minot a kol., 1924) William Damashek v roce 1967 zveřejňuje teorii, že CLL je způsobena akumulací zralých lymfocytů nepodléhajících buněčné smrti. (Dameshek, 1967) V roce 1972 se díky nálezům imunoglobulinů na povrchu CLL zjistilo, že CLL pochází z B lymfocytů. (Aisenberg a kol., 1972) Pro klinickou praxi se stává významný rok 1975, kdy Kanti Rai a kolektiv publikovali dělení CLL na 4 stádia označené římskými číslicemi (0-IV), které využíváme dodnes. Ve stádiu 0 bylo zaznamenáno nejméně úmrtí a medián přežití byl stanoven na více než 150 měsíců, zatímco u pacientů ve stádiích III a IV pouze 19 měsíců. (Rai a kol., 1975) Podobné dělení CLL podle abecedních písmen na tři skupiny (A,B,C) je uveřejněno Binetem a kol. roku 1981. (Binet a kol., 1981) První zjištěná cytogenetická abnormalita v buňkách CLL byla aberace chromosomu 12. (Gahrton a kol., 1980) Imunofenotyp CLL byl detailněji prozkoumán roku 1982. (Caligaris-Cappio a kol., 1982) Roku 1989 FAB klasifikace rozděluje CLL na základě morfologie do typické a atypické podskupiny. Klinický význam těchto podskupin nebyl příliš uznáván a stal se příčinou diskuzí. (Criel a kol., 1999) V roce 1997 byla zjištěna nepříznivá prognostická role inaktivovaného genu *TP53*. V témže roce se zjišťuje souvislost CLL a delecí 11q, která zhoršuje prognózu u pacientů mladších 55 let. (Döhner a kol., 1997) Prognostický vliv mutačního genu pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu byl objeven roku 1999. (Hamblin a kol., 1999)

Roku 1996 byla ustanovena a zveřejněna diagnostická kritéria a kritéria léčebných postupů pro CLL, která byla revidována v roce 2008. (Cheson a kol., 1996) Koncem 20. století se do popředí diskuze dostává role mikroprostředí v patogenezi CLL. (Caligaris-Cappio a kol., 1999)

3.2 Chronická lymfocytární leukémie

3.2.1 Etiologie

Původ onemocnění CLL není doposud znám. Incidence je podle některých autorů čtenější u lidí, kteří byli v kontaktu s azbestem, chemickými rozpouštědly, vystaveni účinkům silných elektromagnetických polí a také u pracovníků v zemědělství. Naopak oproti jiným typům leukémií nebyla doposud zjištěna souvislost s ionizujícím zářením, imunodeficiencemi, viry, působením alkylačních cytostatik a radioaktivním zářením. (Adam a kol., 2008)

3.2.2 Epidemiologie

CLL je nejčastější leukémií dospělých v Severní Americe a Evropě. Podle údajů amerického *National Cancer Institute* představuje 20-30 % všech diagnostikovaných leukémií. Naproti tomu v jihovýchodní Asii je incidence nemoci výrazně nižší, představuje pouze 3-5 % všech leukémií. (Redaelli a kol., 2004)

Nejčastěji postiženou věkovou skupinou je starší populace. Projevuje se hlavně u lidí starších padesáti let. V období 1975-2005 činil průměrný věk pacienta s nově diagnostikovanou CLL 72 let. (Reis a kol., 2008) Onemocnění se vyskytuje častěji u mužů. (Morton a kol., 2006)

Zvýšené riziko výskytu CLL nebo jiné lymfoproliferativní nemoci může být u přímých příbuzných. Familiární výskyt je však vzácný. (Adam a kol., 2008) Dokonce byl popsán fenomén, kdy se u některých rodin CLL projevovala v každé následující generaci v dřívějším věku a s horším průběhem. (Horwitz a kol., 1996)

Výskyt CLL byl v řadě studií značně podhodnocen, protože se v mnoha zemích odhadoval z nádorových registrů. V roce 2001 upozornili autoři Zent a kol. z Arkansasu na nesrovnalost v údajích o incidenci CLL. (Zent a kol., 2001)

Epidemiologická situace o incidenci CLL byla u nás zpracována Doubkem a jeho kolektivem a představena v hematologickém supplementu *Transfúze a hematologie dnes*. (Doubek a kol., 2010) Studie z 90. let 20. století udávají vyšší medián věku výskytu nemoci (72 let). (Reis a kol., 2008) Doubek a kol. ve své práci uvádí medián věku 65 let, který byl zjištěn metodou sběru dat z dotazníků hematologických pracovišť Jihomoravského kraje. (Doubek a kol., 2010)

Zavedení průtokové cytometrie vedlo k zpřesnění diagnostiky CLL a zachycení případů, které v minulosti zůstávaly opomenuty. (Hallek a kol., 2008) Důvodem vyššího věku ve starších studiích může být později diagnostikovaná CLL, kde již došlo k manifestaci onemocnění.

V současné době se onemocnění pomocí dostupnější imunofenotypizace zachytí dříve, kdy bývá ještě klinicky němé, a lidé jsou mladší ve srovnání s lidmi, u nichž došlo k manifestaci nemoci. (Doubek a kol., 2010)

3.2.3 Klinický obraz a průběh nemoci

CLL bývá dlouhé roky bezpříznakové onemocnění. Nemocní jsou většinou diagnostikováni při náhodném vyšetření krevního obrazu, kde je zjištěna leukocytóza s lymfocytózou.

Klinické příznaky se projeví v pokročilém stádiu tkáňovou infiltrací lymfocyty. Buňky CLL produkují cytokiny, které zapříčiní vznik klinických příznaků. Nemocní ztrácí na váze, cítí se malátní, provází je zvýšené noční pocení, neinfekční teploty přesahující 38°C a opakující se bakteriální a virové infekce (obzvláště infekce plic). (Klener a kol., 2003)

Infekce obecně, včetně infekcí způsobené oportunními patogeny (např. *Pneumocystis jiroveci*, *Aspergillus spp.*) patří mezi nejčastější komplikace a příčiny smrti nemocných s CLL. (Mayer a kol., 2002)

V pokročilém stádiu je typické generalizované zvětšení uzlin a sleziny. Může docházet i k infiltraci nelymfatických orgánů (prostata, játer). (Klener a kol., 2003) Extranodální infiltrace většinou nevyvolává symptomy a zjištěna bývá histologickým vyšetřením tkáně. (Mayer a kol., 2002) Lymfatické uzliny jsou často početné, elastické, nebolestivé, volně pohyblivé a můžou se nacházet téměř ve všech lokalizacích (krční, nadklíčkové, axilární, podčelistní, inguinální). (Klener a kol., 2003)

3.2.3.1 Anémie

Anémie u CLL bývá nejčastěji důsledkem masivní infiltrace kostní dřeně v rámci pokročilé choroby. Příčinou jsou uvolněné cytokiny produkované maligními buňkami B-CLL, jenž zároveň utlačují kostní dřeň. Protileukemická léčba, může také přispívat k rozvoji anémie.

U pacientů s CLL je typickou komplikací autoimunitní hemolytická anémie, jejímž charakteristickým projevem v důsledku zvýšení nekonjugovaného bilirubinu je retikulocytóza, zvýšení laktátdehydrogenázy a snížení koncentrace haptoglobinu. (Mayer a kol., 2002) U 10-25 % pacientů se vyskytují protilátky proti erytrocytům, jejichž přítomnost se prokáže pozitivním Coombsovým testem.

Čistá aplázie červené řady postihuje zhruba 6 % pacientů. Hematokrit u této anémie klesá pod 21 %, retikulocyty jsou sníženy pod 0,5 % a normoblasty v kostní dřeni chybí, přičemž je normální počet megakaryocytů a myeloidních prekurzorů. Na základě in vitro laboratorních zkoušek se zjistilo, že T-lymfocyty těchto pacientů inhibují proliferaci erytroidních prekurzorů CFU-E a BFU-E zdravé kostní dřeni.

3.2.3.2 Trombocytopenie

Trombocytopenie je způsobena buď tlumivým vlivem masivní lymfocytární infiltrace kostní dřeni, nebo autoimunitním mechanismem s incidencí kolem 2 %. V případě masivní infiltrace kostní dřeni je snížený počet megakaryocytů, při autoimunitní trombocytopenii se vyskytují protilátky proti trombocytům a je zpravidla dostatečný počet megakaryocytů v kostní dřeni.

3.2.3.3 Imunosuprese

CLL buňky produkují cytokin TGF- β (transforming growth factor β), který potlačuje proliferaci fyziologických B-lymfocytů. U klasického elektroforetického vyšetření nemocných s pokročilou chorobou můžeme vidět typickou nízkou frakci gamaglobulinů. Nejdříve poklesne koncentrace imunoglobulinu IgA a následně IgM a IgG. Snížená koncentrace imunoglobulinů souvisí s nízkými hodnotami sedimentace erytrocytů. Koncentrace imunoglobulinů v plazmě odráží průběh nemoci a může tak napomoci při rozhodování léčby při infekci.

Dále bývá narušena funkce všech T-lymfocytů, snížena aktivita NK-buněk, LAK buněk a cytotoxická aktivita. Důsledkem takto snížené buněčné imunity bývají virová onemocnění, z nichž jsou nejčastější virus herpes simplex a herpes zoster. Proto je důležité okamžité podání protivirových léků.

Počet neutrofilů se s progresí choroby také snižuje a spolu s hypogamaglobulinémií poklesne obranyschopnost proti bakteriálním infekcím. Typickou příčinou smrti nemocných s CLL jsou infekce způsobené běžnými

(Gram-pozitivní i negativní bakterie) i oportunními původci (*Pneumocystis jiroveci*, *Aspergillus spp.*). (Adam a kol., 2008)

3.2.3.4 Výskyt monoklonálního imunoglobulinu

Incidence monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig) bývá přítomna asi u 5-10 % pacientů s CLL. Monoklonální imunoglobulin může způsobovat glomerulonefritidu a nefrotický syndrom či negativně ovlivňovat koagulační kaskádu a funkci trombocytů.

3.2.3.5 Zvýšená viskozita krve

Viskozitu krve zvyšuje až velmi vysoký počet lymfocytů (nad $500 \times 10^9/l$).

3.2.3.6 Transformace choroby

CLL může v některých případech transformovat do lymfoproliferativního onemocnění s agresivnějším chováním, což je označováno jako Richterův syndrom, který se vyskytuje zhruba u 2-8 % nemocných. (Adam a kol., 2008) Převýší-li počet prolymfocytů 55 %, přechází CLL do prolymfocytární leukémie (CLL/PLL). Nejčastějším typem Richterovy transformace je difuzní velkobuněčný B lymfom. Vzácností bývá přechod do akutní lymfoblastické leukémie. (Stano-Kozubik a kol., 2009)

3.2.4 Diagnostická kritéria CLL na základě diferenciálního krevního obrazu

Americký „National Cancer Institute“ v roce 1996 ustanovil a uveřejnil diagnostická kritéria pro stanovení diagnózy CLL. (Cheson, 1996) V roce 2008 byla kritéria revidována organizací International Workshop on Chronic lymphocytic leukemia (IWCLL). (Hallek, 2008) Nezbytnými kritérii pro stanovení diagnózy CLL jsou: 1) Přítomnost lymfocytózy s počtem B-lymfocytů minimálně $5 \times 10^9 /l$ v periferní krvi.

2) Typický imunofenotyp leukemických buněk stanovený průtokovou cytometrií (CD5+/19+/23+).

Kostní dřeň ani mízní uzlinu není nezbytné pro potvrzení diagnózy vyšetřovat. (Adam a kol., 2008)

FAB klasifikace rozlišuje 2 hlavní skupiny CLL **typickou (tCLL) a atypickou (aCLL)**.

U **typické CLL** (přibližně 80 % případů) je nad 90 % cirkulujících lymfocytů malé či střední velikosti s jednotvárně vyzrálými lymfocyty. Pokud jsou přítomné prolymfocyty, představují méně jak 10 % z cirkulujících lymfocytů. (Criel a kol., 1997) **Atypická CLL** je charakterizována proměnlivou velikostí lymfocytů a přítomností prolymfocytů. (Bennett a kol., 1989) U atypické CLL rozlišujeme dvě podskupiny: **dimorfní** a **pleomorfní**. U **dimorfní podskupiny (CLL/PLL)** je počet prolymfocytů zvýšen nad 10 %, ale zároveň nedosahuje 55 %. **Pro pleomorfní variantu** je typická heterogenní populace nádorových buněk. Lymfocyty u aCLL jsou WHO klasifikací definovány jako lymfocyty s málo kondenzovaným jaderným chromatinem a jadernými nepravidelnostmi (např. jaderné zářezy). S atypickou CLL je spojováno vyšší zastoupení markerů s nízkou prognózou jako např. trizomie 12, delecce p17 a nemutovaná forma IgV_H. (Schwarz a kol., 2006; Hamblin a kol., 1999) Obě podskupiny s aCLL predikují časnější nástup progresu a horší prognózu v porovnání s pacienty s tCLL. (Criel a kol., 1997)

3.2.5 Stanovení diagnózy CLL na základě imunofenotypizace

Povrchový imunoglobulin (sIg) je na buňkách CLL slabě exprimován v podobě sIgM nebo sIgD. Přítomny jsou také znaky B lymfocytární řady: CD19, CD20, CD24, CD37, CD40, CD45RA a znaky II. třídy HLA systému.

Mezi typické znaky pro CLL buňky patří:

- CD5 antigen, který se fyziologicky nachází jen na T-lymfocytech a na tymocytech,
- CD23 antigen, jenž je nízkoafinitní Fc-IgE receptor.

Antigen CD22 je u CLL přítomen zejména intracelulárně a jeho exprese na povrchu buněk CLL je slabá nebo žádná. Zatímco u jiných B-lymfatických maligních onemocnění se CD22 exprimuje jak na povrchu, tak i v cytoplazmě. Pouze výjimečně se na buňkách CLL nachází antigen FMC7 (< 4 %), jenž je pravidelně přítomen na buňkách prolymfocytární nebo vlasatobuněčné leukémie. (Adam a kol., 2008)

Moreau a kol. dle těchto údajů navrhl skórovací systém pro odlišení CLL od jiných B-lymfoproliferativních chorob. Skóre hodnotí expresi znaku, který je stanovený průtokovou cytometrií. (Moreau a kol., 1997)

Tabulka 1: Skórovací systém CLL na základě průtokové cytometrie dle Royal Marsden

znak	přítomnost znaku	body
CD5	+	1
povrchový CD22	-	1
CD23	+	1
slg	slabě +	1
FMC7	-	1
Pacienti s CLL mají v 87 % skóre 4-5, skóre 0-1 mají jen 0,4 % pacientů. Pacienti s jinými lymfoproliferacemi mají v 89 % skóre 0.		

Zdroj: Moreau a kol., 1997

3.2.6 Prognostické faktory chronické lymfocytární leukémie

Prognostické faktory CLL by měly napomoci určit tu skupinu pacientů, u kterých bývá prognóza horší vzhledem k celkovému přežití a ověřit smysl časných léčebných postupů. Praktický význam mají prognostická vyšetření obzvláště u mladších pacientů v dobrém stavu, u kterých je možná agresivní léčba zahrnující intenzivní chemoimunoterapii či alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk.

Prognóza u CLL je velmi heterogenní a dnes již díky novým diagnostickým metodám bývá rozpoznávána v počátečním stádiu (Binet A, Rai 0) a jen málo v pokročilém. Dnes je to okolo 80 % pacientů, kteří jsou diagnostikováni v časném stádiu nemoci. Z toho u celé poloviny sledovaných pacientů dochází k progresi onemocnění a terapie je zahájena relativně časně. (Kozák, 2010a)

Od zavedení klinických stádií dle Raie a Bineta bylo zkoumáno značné množství potenciálních prognostických markerů. Při vyhledávání v PubMedu se zobrazí více než 550 odkazů na zadaný výraz „CLL a prognostické faktory“. Proto by měli být zkoumány zejména ty markery, které jsou snadno použitelné a s velkou pravděpodobností přináší nezávislou prognostickou informaci doplňující konvenční markery. Nové prognostické markery musí být plně standardizovány, validovány a jejich prognostická hodnota musí být ověřena ve velkých prospektivních klinických studiích, než budou zavedeny do běžné klinické praxe. (Moreno a kol., 2008)

Na základě multivariantních analýz byl prokázán nezávislý nepříznivý prognostický vliv řady faktorů zahrnující:

- vyšší věk,
- vysoký počet lymfocytů v době diagnózy,
- pokročilá klinická stádia (Rai III/IV, Binet C),
- zvýšená aktivita laktátdehydrogenázy (LDH),
- zvýšená sérová koncentrace beta2-mikroglobulinu,
- nemutované IgV_H geny,
- delece (17p),
- delece (11q).

Prognóza pacienta je ovlivněna celkovým stavem pacienta, množstvím masy maligních buněk, rychlostí progresu nemoci a léčebnou odpovědí.

Obr. 1: Vliv rozhodujících faktorů na prognózu pacienta



3.2.6.1 Klasické prognostické faktory

a) klinické stážování

Pro rozlišení míry pokročilosti choroby a velikosti masy maligních buněk se uplatňují již téměř 30 let kritéria definovaná dle Raie a kol. (1975) a Bineta a kol. (1981). Určení klinického stádia dle stanovených kritérií má prognostický význam a slouží jako základ každého rozhodování léčebného postupu. Oba systémy jak podle Raie, tak stážování podle Bineta jsou založeny na fyzikálním vyšetření a vyšetření krevního obrazu. (Mayer a kol., 2002)

Tabulka 2 Klinické stádování dle Raie a kol.

Stádium	Charakteristika	Medián přežití v původní publikaci (měsíce)
0	pouze lymfocytóza	> 150
I	lymfocytóza a lymfadenopatie	101
II	lymfocytóza se zvětšenou slezinou a /nebo játry	71
III	lymfocytóza a anémie s Hb < 110 g/l	19
IV	lymfocytóza s trombocytopenií < 100 * 10 ⁹ /l	19

Zdroj: Kozák, 2008

Tabulka 3 Klinické stádování dle Bineta a kol.

Stádium	Charakteristika	Medián přežití v původní publikaci (měsíce)
A	postižení < 3 oblastí	neodlišuje se od běžné populace
B	postižení ≥ 3 oblastí	84
C	anémie a trombocytopenie (Hb < 100g/l a nebo trombocyty < 100 * 10 ⁹ /l)	24
Postižené oblasti: krční, axilární, tříselné, mízní uzliny, slezina a játra. (Každá z těchto oblastí se počítá za jednu postiženou oblast).		

Zdroj: Kozák, 2008

b) zdvojovací čas lymfocytů (LDT- lymphocyte doubling time)

Jeden ze standardních indikátorů pro posouzení potřeby zahájit léčbu je dynamika nárůstu lymfocytů. K posouzení nám slouží zdvojovací čas lymfocytů (LDT), což je doba, za kterou dojde k nárůstu lymfocytů v periferní krvi o 100 % z původní hodnoty pod dobu kratší 6 měsíců nebo k nárůstu počtu lymfocytů o 50 % pod 2 měsíce. K těmto kritériím však musíme přistupovat s určitou obezřetností.

Je nezbytné vyloučit jiné faktory nárůstu počtu lymfocytů - zejména infekční příčiny a u některých pacientů např. s absolutní lymfocytózou pod $30 \times 10^9/l$ je nutností dlouhodobé sledování. Pacienti s LDT delší než 12 měsíců mají průběh nemoci více indolentní a tím i delší přežití.

c) typ infiltrace kostní dřeně

Více než 30 % jaderných buněk z aspirátu kostní dřeně je lymfoidních. (Bergmann a kol., 2007) Je-li infiltrace kostní dřeně difuzní, představuje pro pacienta nepříznivou prognózu (3 - 5 let) než infiltrace nedifuzní (10 let). (Mayer a kol., 2002) Tato prognostická hodnota biopsie kostní dřeně může být již v dnešní době nahrazena novými prognostickými markery. (Bergmann a kol., 2007) I přes to, že aspirát či biopsie kostní dřeně nejsou po diagnózu CLL potřebné, tak mohou přispět k posouzení faktorů, které vedou ke vzniku cytopenie (anémie, trombocytopenie) jak před terapií, tak i během ní. (Molica a kol., 2006). Význam typu infiltrace kostní dřeně ovšem v současné éře chemoimunoterapie a cílených preparátů výrazně poklesl.

d) morfologie lymfocytů v periferní krvi

Prognózu přežití zhoršuje počet prolymfocytů vyšší než 5 %. Pro lymfocyty CLL je typická morfologická heterogenita. Vliv morfologické variability na prognózu CLL je přijímán kontroverzně. V této práci je studován význam atypické morfologie leukemických buněk CLL.

e) počet lymfocytů v periferní krvi a koncentrace hemoglobinu

Tumorózní masa odpovídá počet lymfocytů. Čím vyšší je počet lymfocytů, tím kratší je doba přežití. Pacient s počtem lymfocytů nad $50 \times 10^9/l$ má kratší dobu přežití (3-4 roky) než pacient s počtem lymfocytů pod $50 \times 10^9/l$ (6 a více let).

Dalším prognostickým faktorem pro pacienty s CLL je výchozí koncentrace hemoglobinu v počátcích klinického stádia → s klesající koncentrací se horší prognóza.

3.2.6.2 Nové prognostické faktory CLL

Sofistikované metody molekulární genetiky jako je např. PCR, sekvenování nové generace umožňují studovat nové prognostické markery na molekulární úrovni. Zjištěné znalosti umožňují pochopit molekulární mechanismy během patogeneze nemoci, odhalit nové mutace genů související s CLL nebo prozkoumat vliv angiogeneze na patogenezi CLL. Do intenzivně studovaných genových mutací můžeme zařadit mutace v genech *TP53*, *ATM*, *NOTCH 1*, *SF3B1*, *BIRC3*, *subgeny IGHV3-21 a IGVH1-69*. Mezi detailně prostudované biologické markery řadíme: cytogenetické aberace vyšetřované fluorescenční in situ hybridizací (delece 11q, delece 17p, delece 13q; trizomie 12), mutační stav IgV_H a expresi znaků CD38 a ZAP-70. Mnoho dalších kandidátů na prognostické markery je stále studováno v řadě prospektivních studií a výzkumů.

Tabulka 4 Prognóza pacientů s různými cytogenetickými změnami

Cytogenetická abnormalita	Medián přežití (měsíce)	Medián přežití bez léčby (měsíce)	Defekt na úrovni DNA
Del (17p)	32	9	P53
Del (11q)	79	13	ATM
Trizomie 12	114	33	Není znám
Normální karyotyp	110	49	-
Del (13q)	133	92	mikro RNA (15?)

převzato z: Kozák, 2010

3.2.6.3 Cytogenetika a molekulární cytogenetika

Konvenční cytogenetické metody založené na pruhování chromozomu jsou u CLL obtížné, zejména z důvodu nízké in vitro mitotické aktivity nádorových buněk, což vede ke špatnému množství a kvalitě v metafázním rozložení. Fluorescenční in situ

hybridizace (FISH) umožňuje překonávat jak nízkou mitotickou aktivitu u CLL buněk, tak i nedostatek vhodných kandidátních genů, které jsou například pro molekulární genetickou analýzu nezbytné. FISH metodou lze detekovat cytogenetické abnormality u více než 80 % všech případů CLL. Pomocí FISH detekujeme chromozomální aberace v jedné buněčné úrovni dělicích se i nedělicích se buněk, čímž se obchází potřeba metafázických příprav z nádorových buněk.

Vyhodnocení výskytu chromozomálních aberací u CLL pomocí FISH umožňuje korelovat genetické abnormality s klinickými projevy a výsledkem onemocnění. U delecí v oblasti 11q a 17p již bylo prokázáno, že jsou jedním z nejvýznamnějších nezávislých prognostických faktorů, určujících podskupiny pacientů s progresí onemocnění s rychlou či krátkou dobou přežití. Kromě toho je delece 17p spojována s chemorezistencí. (Stilgenbauer a kol., 2000)

Delece 13q14

U více než 50 % pacientů s CLL se vyskytuje delece dlouhého raménka chromosomu 13 ve 14 lokusu. Vyskytuje-li se tato delece, jako jediná genetická abnormalita, má pacient vynikající prognózu s dlouhým celkovým přežitím.

Trizomie 12

Trizomie chromosomu 12 je detekována u 10 - 25 % pacientů. I přes to, že tato trizomie byla detekována jako první aberace, její prognostický význam není stále zcela jasný. Představuje pravděpodobně intermediární prognózu. (Kienle a kol., 2005)

Delece 11q22-q23

Delece dlouhého raménka chromosomu 11 v lokusu 22 nebo 23 se vyskytuje u 10-20 % nemocných s CLL. (Döhner a kol., 1997) Tato delece zasahuje nádorový supresor ATM. Protein ATM je součástí detekce poruchy DNA nad proteinem p53. Často u této delece dochází k masivní lymfadenopatii. Delece 11q je spojována se špatnou prognózou, její nepříznivý dopad však může překonat intenzivní chemoimunoterapie.

Delece 17p13

Delece krátkého raménka chromosomu 17 většinou v oblasti 13 souvisí se ztrátou nádorového supresoru p53. Ztráta a/nebo mutace genu *TP53* přináší velmi nepříznivou prognostickou informaci. P53 je nezbytný pro indukci zástavy buněčné proliferace nebo pro apoptózu při poškození jaderné DNA. Bylo zjištěno, že mutace p53

nemusí být spojena s del 17p. Recentní práce italských autorů potvrdila stejnou negativní prognostickou hodnotu mutace p53 jako má delece 17p. Alely genu p53 musí být většinou inaktivované obě, neboť mutace pro gen p53 je recesivní. Inaktivace první alely je způsobena nejčastěji bodovou mutací, načež druhá alela nejčastěji podléhá kompletní deleci. Z důvodu rozdílné inaktivace se používají rozdílné metody k vyšetření. První alelu lze vyšetřit sekvenací nebo funkční analýzou FASAY a pro druhou alelu je vhodná metoda FISH. Často bývá žádoucí opakované vyšetření při každé progresi nemoci nebo při vzniku rezistence v průběhu terapie, poněvadž cytogenetický nálezný a funkční stav p53 se v průběhu onemocnění může měnit.

U pacientů s rizikovou cytogenetikou a odpovídajícím fenotypem bývá zvažována jiná iniciační léčba s novými nadějnými látkami nebo alogenní transplantace krvetvorných buněk, jelikož zde konvenční léčba nedává šanci na déle trvající úspěch. (Adam a kol., 2008)

Mutační stav IgV_H

V současné době, je stav mutace IgV_H genu považován za jeden z nejvýznamnějších faktorů pro stanovení prognózy u CLL pacientů, avšak pod podmínkou, že je nukleotidová sekvence určena přesně a interpretována obezřetně. (Van Bockstaele a kol., 2009) Velkou výhodou stanovení IgV_H genu oproti jiným markerům je jeho stálost během celého klinického průběhu CLL, a proto je možné jej stanovit v jakémkoli stádiu nemoci CLL. Pacienti s nemutovaným IgV_H genem (definováno jako ≥ 98 % shoda se sekvencí odpovídající germinální linie) mají nepříznivé klinické výsledky. (Bergmann a kol., 2007) CLL můžeme dle vzniku v podstatě rozdělit na dvě podmnožiny:

1. **CLL s příznivým průběhem**, která vzniká z lymfocytů procházejícím zárodečným centrem lymfatického folikulu. Lymfocyty obsahují **mutovanou** informaci pro těžký řetězec imunoglobulinu, proto vykazují časté změny ve VH sekvencích.
2. **CLL s agresivní formou**, jež vzniká z naivních (pregerminálních) B-lymfocytů. Naivní lymfocyty mají **nemutovanou** informaci pro těžký řetězec imunoglobulinu, jelikož neprošli zárodečným centrem.

Výjimkou je přestavba genetické informace ve variabilní části těžkého řetězce IgV_H, označovaná jako **VH3-21**, jež koreluje s velmi nepříznivou prognózou. Tento typ mutace souvisí s četným výskytem mutace p53. (Adam a kol., 2008)

Poruchou alelické exkluze nádorové buňky může docházet k mutaci více než 1 genu IgV_H . (Rassenti a kol., 2000)

ZAP-70 a CD38

Zeta asociovaný protein ZAP-70 a transmembránový glykoprotein CD38 patří mezi nepříznivé prognostické faktory CLL a signalizují agresivnější průběh nemoci. Oba znaky mohou být stanoveny průtokovou cytometrií. Exprese uvedených znaků CD 38 a ZAP70 se však během průběhu nemoci může měnit, proto při nové progresi je třeba vyšetření opakovat. (Adam a kol., 2008) Exprese CD38 ani ZAP-70 však vůči mutačnímu stavu IgV_H nepřinášejí zásadní prognostickou informaci, navíc stanovení ZAP-70 bylo zatíženo metodickou nejednotností a bylo pro rutinní praxi opuštěno. (Navrkalová a kol., 2015)

Lipoproteinová lipáza

Některá pracoviště se věnují studiu lipoproteinové lipázy (LPL), jež by mohla nahradit náročnější stanovení mutačního stavu IgV_H . Shoda s mutačním stavem IgV_H je vysoká, přesto nijak významně nepřekračuje ZAP70. Vyšší exprese LPL taktéž slouží jako nepříznivý ukazatel prognózy. (Heintel a kol., 2005)

Uvedené znaky slouží jako doplňková informace pro stanovení prognózy CLL, avšak spolehlivě nenahradí marker pro mutační stav IgV_H .

Sérové markery

Na základě prospektivních studií byly zjištěny v séru pacientů s CLL markery jako **laktátdehydrogenáza**, **β_2 mikroglobulin**, **thymidinkináza**. Zvýšená sérová koncentrace těchto markerů je obvykle spojena s horší prognózou a s agresivnějším průběhem onemocnění. Nestandardizovaná metodika a rozdílná hranice v různých studiích je společný problém stanovení sérových markerů prognózy u CLL. (Hallek a kol., 1996)

Odezva na léčbu jako prognostický znak

Horší prognózu mají ti pacienti, u nichž není žádná odpověď na léčbu nebo brzy po léčbě dojde k relapsu onemocnění. (Kozák, 2010a) V souvislosti s CLL je v posledních letech upřena pozornost na minimální reziduální nemoc (MRN), což je

přítomnost zbytkové leukemické populace zjistitelné v periferní krvi či kostní dřeni pouze vysoce citlivými metodami. MRN lze stanovit alelově specifickou PCR nebo vícebarevnou průtokovou cytometrií. (Doubek M, 2015) Kombinovaná chemoimunoterapie nebo alogenní transplantace krvetvorných buněk umožňují snížit její výskyt a eradikovat ji. (Burger, 2014; Furman, 2014) V současnosti přibývá důkazů pro nezávislý prognostický význam eradikace MRN pro období do progresu i celkové přežití. (Doubek M, 2015)

3.2.7 Cytomorfologické nálezy u CLL

Cytomorfologický nále z nátěru periferní krve CLL napomáhá k nasměrování dalších laboratorních postupů, které umožní potvrdit podezření na diagnózu leukémie/lymfomu.

Typickou formu CLL tvoří nádorová uniformní populace lymfocytů. Tyto lymfocyty jsou o trochu větší než malý zralý lymfocyt, mají kulaté či oválné jádro s hutným, kondenzovaným chromatinem a jádérka nemají patrná. (Farhi a kol., 2004) Cytoplazma vytváří úzký asymetrický lem, který je dán excentricky uloženým jádrem v buňce; bývá většinou agranulární, slabě bazofilní a jen zřídka obsahuje inkluze či vakuoly. Pro tyto nádorové lymfocyty je typická fragilita, a proto nacházíme v nátěru velké množství jaderných stínů a rozpadajících se buněk. Jaderné stíny se v případě CLL historicky označují jako „Gumprechtovy stíny“, v anglosaské literatuře smudge cells. (Bain a kol., 1992) Přítomnost prolymfocytů u této formy nedosahuje více než 10 %.

U atypické CLL rozlišujeme dvě varianty: **dimorfní** a **pleomorfní**. (Kačirková a kol., 2007) Atypické lymfocyty jsou větší buňky s velkými jádry a bohatou, světle modrou cytoplazmou. Jádro je oválné, laločnaté i štěpené s typicky jedním či méně často více jádérky. Jaderný chromatin je středně kondenzovaný.

Prolymfocyty jsou dvakrát tak větší než malý lymfocyt. Jádro má kondenzovaný chromatin s nápadným jádérkem a v typickém případě jej symetricky obklopuje slabě až středně bazofilní cytoplazma bez granulace. Prolymfocyty však nejsou vždy typické. Jejich proměnlivost může být jak ve velikosti buňky, tak i v nukleo-cytoplazmatickém poměru a jádérko nemusí být vždy přítomné.

Pro pleomorfní variantu je typická heterogenní populace nádorových buněk. Pro tyto lymfocyty je charakteristická různá velikost, různý poměr jádra k cytoplazmě,

jaderné zářezy a také určitý podíl prolymfocytů, jenž je většinou nižší než u varianty dimorfní. Může se také vyskytnout i přítomnost imunoblastů. **Imunoblasty** jsou velké buňky s kulatým až oválným jádrem, které je obklopeno chudší či středně bohatou bazofilní cytoplazmou bez granulace. Chromatin jádra je středně kondenzovaný s nápadnými jadérky, jež jsou obvykle zbarvená do modra. (Farhi a kol., 2004)

Gumprechtovy stíny jako první popsal Gumprecht roku 1896 v krevních nátěrech pacientů s lymfatickou leukémií. Tyto rozpadlé buňky se staly charakteristickým znakem CLL, zřídka se vyskytující u jiných lymfoproliferativních leukémií. (Gumprecht, 1896; Macdonald a kol., 2003) Zpočátku se domnívalo, že jsou to pouze artefakty způsobené přípravou sklíčka. (Binet a kol., 1981) První domněnka, že Gumprechtovy stíny mohou být biologicky významné, přišli ze dvou zajímavých studií roku 1950. Tyto studie poukazovali na procento Gumprechtových stínů jako na nezávislý stupeň lymfocytózy a zároveň se zdály být specifické pro určité pacienty. (Heinivaara, 1959) Nowakowski a kol. ve své práci z roku 2005 referují, že tvorba jaderných stínů souvisí s obsahem cytoskeletálního proteinu **vimentinu**. (Nowakowski a kol., 2005) Vimentin patří mezi intermediární filamenta a je rozhodující pro tuhost a integritu lymfocytů. (Brown a kol., 2001) Autoři také zjistili, že u pacientů s CLL s vysokým obsahem vimentinu je nízký podíl jaderných stínů a je zkrácena doba do počáteční terapie v rané fázi CLL. (Nowakowski a kol., 2005) Exprese vimentinu je prognostický faktor v časně fázi CLL, proto se předpokládá, že by mohl být i vztah mezi procentem jaderných stínů a prognózou u pacientů s CLL.

3.2.8 Léčba

3.2.8.1 Indikace k zahájení léčby

Jsou definovány podle mezinárodně přijímaných kritérií International Workshop on CLL.

Obecně lze říci, že léčba je u CLL zahájena, jakmile se začnou projevovat klinické příznaky. Léčba je založena zejména na kombinaci chemoterapie a biologické léčby, jež umožňuje uvést pacienta do stavu bez minimální reziduální choroby. Léčba je indikována podle klinického stádia, dynamiky a aktivity onemocnění. (Hallek, 2008)

Tabulka 5 Shrnutí indikací k léčbě na základě kritérií IWCLL.

1.	Přítomnost alespoň jednoho z následujících klinických symptomů: <ul style="list-style-type: none"> • úbytek hmotnosti $\geq 10\%$ za půl roku, • výrazná malátnost a slabost, která brání vykonávat běžnou denní práci, • neinfekční teploty trvající déle než 2 týdny, • noční pocení bez přítomnosti infekce.
2.	Postupné zhoršování krvetvorby, rozvoj nebo zhoršování anémie nebo trombocytopenie.
3.	Autoimunitní anémie nebo trombocytopenie neúspěšně léčená glukokortikoidy.
4.	Masivní splenomegalie nebo její progresse.
5.	Masivní pakety uzlin, ≥ 10 cm v nejdelším průměru, nebo progresse lymfadenopatie.
6.	Progrese lymfocytózy se vzestupem počtu lymfocytů o $> 50\%$ za 2 měsíce nebo předpokládaný zdvojovací čas kratší než 6 měsíců.

Pozn.: Léčba je zahájena, splňuje-li pacient alespoň jednu podmínku. Je-li pacient ve stádiu Rai III a IV doporučuje se zahájit léčbu ihned. (Kozák, 2010b)

Hlavním cílem léčby je navození kompletní remise. U pacienta v kompletní nebo parciální remisi po plánované léčbě je tato léčba ukončena a nemocný je nadále pravidelně sledován s cílem posouzení klinického stavu a rozpoznání relapsu nemoci. CLL se v průběhu nemoci může transformovat do agresivnějšího typu lymfomu nebo se postupně stane rezistentní na léčbu. (Adam a kol., 2008)

Asymptomatictí pacienti diagnostikováni v časném stádiu onemocnění (Rai 0, Binet A) jsou sledováni bez léčby až do propuknutí progresse nemoci. Publikované klinické studie zejména z 90. let dvacátého století neprokázaly pozitivní vliv alkylačních látek na dobu přežití u pacientů v časných stádiích onemocnění. V některých studiích byla časná terapie spojována s větším výskytem sekundárních malignit a kratší dobou přežití.

Na pacienty se středně pokročilým (I, II Rai; B Binet) a vysoce rizikovým (III, IV Rai; C Binet) onemocněním má zahájená léčba příznivý vliv. I přes to, však mohou být někteří pacienti (zejména ve středním stádiu nemoci) bez léčby a dobře prospívat, až do stavu progresse nemoci či projevům symptomů.

I v současné době je CLL nadále považována běžnými metodami za nevléčitelnou chorobu. V současné době však můžeme pomocí terapie docílit dlouhotrvající kompletní remise a to i na molekulární úrovni a prodloužení celkového přežití. Navození kompletní remise je zpravidla spojeno se zlepšením kvality života. Cílem terapie pro starší pacienty je udržet především stávající kvalitu života, kterou lze dosáhnout pomocí paliativní léčby. Podpůrná terapie se stala součástí každé léčby a je zaměřená především na korekci imunodeficitu a cytopenií. (Kozák, 2010b)

3.2.8.2 Léčebné možnosti u CLL

Nejdéle užívaným preparátem u CLL je alkylační cytostatikum chlorambucil. Tento lék je volbou zejména pro starší polymorbidní pacienty, u kterých by agresivnější léčba vyvolala nepříjemnou toxicitu. V současné době je pro starší / komorbidní nemocné standardem kombinace chlorambucilu s některou z anti-CD20 monoklonálních protilátek (rituximab, ofatumumab či obinutuzumab). (Smolej, 2015) Pro mladší nemocné v dobrém celkovém stavu je zlatým standardem chemoimunoterapie kombinující fludarabin, cyklofosfamid a rituximab (protokol FCR). (Hallek, 2010) U relabující / refrakterní choroby jsou nyní hlavní léčebnou možností nové cílené inhibitory signálních drah B-buněčného receptoru ibrutinib a idelalisib - tyto preparáty revolučním způsobem zlepšily osud nemocných s relabující/refrakterní chorobou. Mezi další možnosti patří kombinace bendamustinu a rituximabu, anti-CD52 monoklonální protilátka alemtuzumab či režimy založené na vysokodávkovaných kortikoidech. (Smolej, 2015)

I přes všechny dosavadní úspěšné léčebné postupy je pro CLL relaps neodvratný a pacienti se postupně stávají neodpovídajícími na léčbu. Pro některé pacienty, zejména ty mladší s vysoce nepříznivým klinickým průběhem, je alogenní transplantace kostní dřeně jedinou možností na trvalé vyléčení. Tento rizikový zákrok je však vhodný pouze pro malou, vysoce selektovanou skupinu pacientů. (Válková, 2010)

3.3 Vývoj lymfocytu

V kostní dřeni začíná vývoj všech krevních buněk.

Pluripotentní kmenová buňka je společným základem pro všechny krvinky a její diferenciací se vytváří **progenitorové kmenové buňky**. Z progenitorových buněk se diferenciací stávají buňky **prekurzorové** jednotlivých krevních řad.

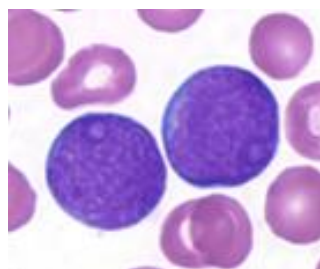
V kostní dřeni se z progenitorových buněk vytváří **B-lymfocyty** a prothymocyty. **T-lymfocyty** se tvoří v thymu z prothymocytů, jenž sem přestoupili cirkulací z kostní dřeni. B-,T- lymfocyty dále cirkulují do sekundárních lymfatických orgánů, kde se setkávají s antigeny. Antigen lymfoidní buňky aktivuje a způsobí tak jejich přeměnu v **lymfoblasty**. Je-li aktivován specifickým antigenem B-lymfocyt, může se diferencovat do stádia **plazmatických buněk**, které produkují protilátky. (Pecka a kol., 2002)

Vývojová stádia lymfocytu

1) LYMFOBLAST

Průměr lymfoblastu činí 10-14 μm . Jádro má velké, oválné nebo kulaté s 1-5 jasně ohraničenými jadérky. Odstín jádra je světlejší než u lymfocytu. Chromatin jádra je jemného a plst'ovitého vzhledu. Cytoplazmu má lehce bazofilní bez granul a kolem jádra často vytváří úzký lem.

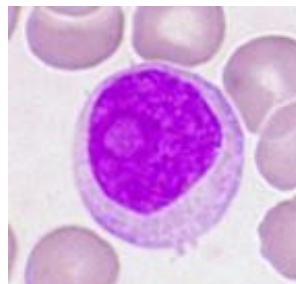
Obr. 2: Lymfoblast



2) PROLYMFOCYT

Průměr lymfoblastu je 13-16 μm . Jádro je oválné a jadérko je zpravidla výrazně viditelné. Jaderný chromatin je hrubší než u lymfoblastu. Zbarvení cytoplazmy je světle modré, většinou bez granulace.

Obr. 3: Prolymfocyt

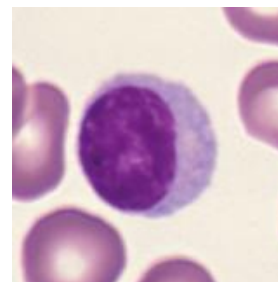


Fyziologicky se v obvodové krvi vyskytují pouze zralé lymfocyty.

MALÝ LYMFOCYT

Obr. 4: Malý lymfocyt

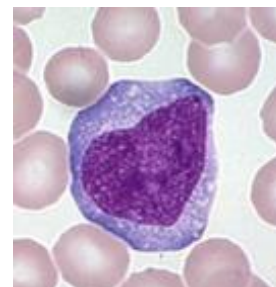
Průměr malého lymfocytu je 8-12 μm . Jádru je kulaté nebo oválné a vyplňuje velkou část buňky. Tmavě hutný a bohatý chromatin bývá stočen do husté spleť vláken a uzlů. Jadérko není viditelné. Cytoplazma je bezbarvá až světle modrá, většinou s úzkým lemlem kolem jádra.



VELKÝ LYMFOCYT

Obr. 5: Velký lymfocyt

Průměr velkého lymfocytu je 12-16 μm . Jádru je podobné jako u malého lymfocytu. Chromatin je hutný a světlejší. Cytoplazma je bohatší, lehce bazofilní a může obsahovat granula. (Penka a kol., 2011; Pecka, 2002)



3.4 Laboratorní vyšetření morfologie buněk CLL

3.4.1 Preanalytická fáze

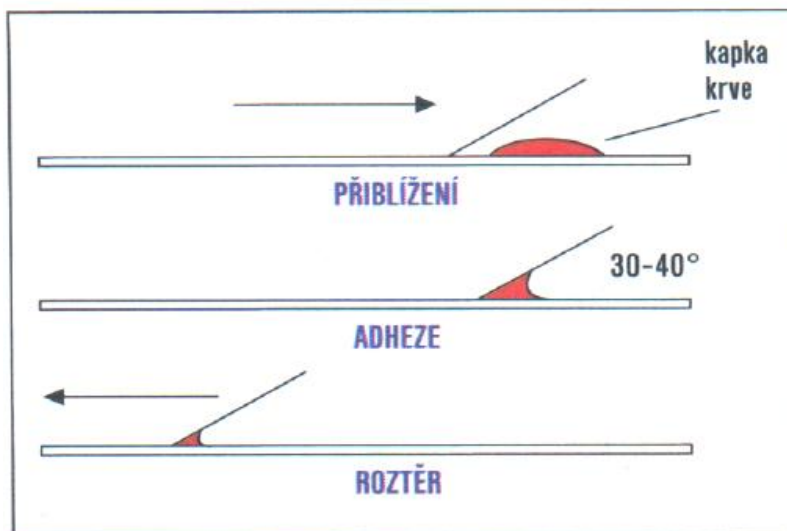
Dodržování zásad preanalytické fáze je základním předpokladem pro precizní laboratorní diagnostiku. Preanalytická fáze zahrnuje všechny postupy, kterými biologický vzorek prochází od okamžiku, kdy prokazatelně vznikl jeho požadavek na analýzu, do okamžiku jeho požadavku ke zpracování. Záleží nejen na správně provedené preanalytické **laboratorní** části, kde je nutné vzorek přijmout, registrovat a připravit před vlastní analýzou, ale i na důkladné preanalytické **mimolaboratorní** části, kam spadá příprava pacienta před odběrem, odběr biologického materiálu a jeho následný transport do laboratoře. Všechny postupy preanalytické fáze se řídí platnými standardními operačními postupy (SOP) pro jednotlivá vyšetření. (Bartoš, 2005)

Pro vyšetření krevního obrazu s diferenciací je periferní krev odebrána do zkumavky se solí EDTA (nejčastěji K_3EDTA). Krev je v protisrážlivém činidlo stabilní až 5 hodin při laboratorní teplotě (+15 až +25° C).

3.4.2 Zhotovení krevního nátěru

V dnešní době se krevní nátěry stále častěji zhotovují pomocí poloautomatů a automatů. Manuální zhotovení krevního nátěru pomocí roztěrového sklíčka má stále svůj opodstatněný význam. Sklon úhlu, který by měl být mezi 30-40° je velmi důležitý, protože ovlivňuje sílu nátěru. V případě, že potřebujeme zhodnotit např. leukopenický vzorek, sami můžeme zvolit větší úhel pro dosažení hustšího nátěru. Zhotovený nátěr by měl být homogenní, rovnoměrný a přiměřeně tenký s dlouhými rovnými okraji a před koncem sklíčka přechází do ztracena. (Pecka a kol., 2010)

Obr. 6: Zhotovení krevního nátěru



Zdroj: Pecka a kol., 2010

3.4.3 Barvení krevního nátěru

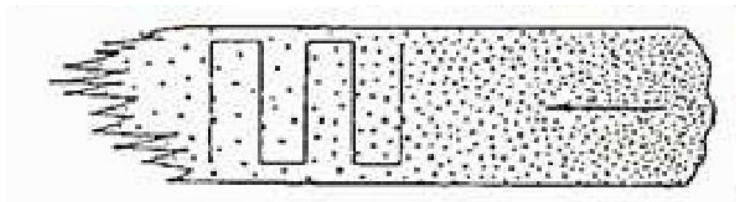
Zhotovené krevní nátěry se nejčastěji fixují May-Grünwaldovým roztokem, jenž jako hlavní fixační složku obsahuje metanol. (Marthy a kol., 1974) Nátěr je následně barven Pappenheimovou metodou, která obsahuje kombinaci dvou barviv May-Grünwald a Giemsa-Romanowski. Roztok May-Grünwald obsahuje barvicí složku eozin Y, jenž zbarvuje eozinofilní granula a neutrofilní granulaci leukocytů. Roztok Giemsa-Romanowski obsahuje azurové barvivo, které obarvuje cytoplazmu monocytů, lymfocytů, granula bazofilů a sekundární granula neutrofilů. (Mikulenková a kol., 2016)

3.4.4 Zhodnocení krevního nátěru

Nejprve se krevní nátěr přehledně zhodnotí při zvětšení 100 - 200x. Tímto zvětšením hodnotíme buněčnost, kvalitu, obarvení nátěru a rozložení jaderných buněk. Následně si najdeme optimální místo k počítání leukocytů. K hodnocení buněčné morfologie volíme imerzní objektiv se zvětšením 500-1000x.

Hodnotíme v části nátěru, ve které jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny (erytrocyty se nepřekrývají). Řádně zhodnotit nátěr nám umožní meandrovitý způsob hodnocení.

Obr. 7: Meandrovitý způsob prohlížení nátěru



Zdroj: Matýšková a kol., 2016

Rozpočet leukocytů v periferní krvi se obvykle počítá na 100 jaderných buněk. U patologických nálezů se doporučuje hodnocení na 200 leukocytů, zatímco například u dřevných útlumů se vzhledem k nízké buněčnosti v některých případech hodnotí na nižší počty. Ostatní krevní elementy (erytrocyty, trombocyty) se zhodnotí popisem. Přítomnost normoblastů se vyčísluje na 100 leukocytů. Fyziologicky je nalézáme pouze u novorozenců. Morfologické změny zhodnotíme popisem po prohlédnutí celého nátěru.

Zastoupení jednotlivých populací buněk je zaznamenáváno pomocí hematologického sumátoru a vyjadřuje se v procentech. Výsledky zhodnoceného nátěru zaeviduje zdravotní laborant do laboratorního informačního systému (LIS). (Matýšková a kol., 2016)

4 Metodiky

4.1 Příprava nátěrů periferní krve

4.1.1 Zhotovení nátěru periferní krve

Nátěry byly zhotoveny dvěma způsoby:

- pomocí nátěrového automatu **SP-1000i (Sysmex)**
- manuálně

Zhotovení nátěrů pomocí SP-1000i

Nátěrový a barvicí automat **SP-1000i** je součástí automatické linky firmy Sysmex. Krevní nátěry jsou automaticky zhotoveny, je-li žádán mikroskopický rozpočet nebo při hlášení tzv. „flags“ analyzátozem krvinek. Tyto hlášky upozorňují na morfologické a početní abnormality jednotlivých buněčných populací a subpopulací. Automatická linka při výskytu patologie v krevním nátěru provede zhotovení nátěru, fixaci a barvení automaticky. Automat SP-1000i při zhotovení nátěru zohledňuje hodnotu hematokritu daného vzorku. Natřené sklíčko je označeno identifikačními údaji pacienta a je přesunuto do barvicí kyvety, kde je obarveno.

Manuální zhotovení nátěrů

Uzávěr odběrové nádoby se nasadí na propichovací adaptér a na okraj podložního sklíčka se kápne kapka krve. Roztěrové sklíčko se přiloží před kapku krve a pod úhlem 30 - 40° se rozetře rovnoměrným pohybem směrem ke kapce a pak k opačnému konci podložního sklíčka. (*viz Obr. 6: Zhotovení krevního nátěru*) Sklíčko označíme datem, jménem pacienta, žadacím oddělením a laboratorním číslem.

Hodnoceny byly především nátěry provedené manuální technikou (*celkem 87*) a menší část (*celkem 14*) nátěrů zhotovená automatem. Upřednostňovány byly nátěry zhotovené manuální technikou kvůli hodnocení jaderných stínů, které jsou pro CLL typické. Nátěry provedené barvicím a nátěrovým automatem mohou mít vyšší počet jaderných stínů. Příčinou bude zřejmě vyšší působící síla (tlak) na buňky při jejich roztěru, a proto jsou lymfocyty snáze mechanicky poškozeny.

4.1.2 Manuální barvení krevních nátěrů

Přístroje a pomůcky

Mikroskop, sumátor buněk, barvicí kyvety, odměrný válec na 100 - 200 ml.

Spotřební materiál

Podložní sklíčko, roztěrové sklíčko, gáza, propichovací adaptér na odběrové nádobky, imerzní olej, směs benzín- éter, lihobenzín, metanol.

Reagencie

- May-Grünwald - balení: 1000 ml (výrobce PENTA; výrobce Kulich s.r.o.)
balení: 2500 ml (výrobce RAL - distributor Diagnostica a.s.)
složení: eozin, metylenová modř, metylalkohol, glycerol
- Giemsa-Romanowsky - balení: 1000 ml
(výrobce PENTA; výrobce Kulich s.r.o.)
balení: 2500 ml
(výrobce RAL - distributor Diagnostica a.s.)
složení: azureozin II, azur II, glycerol, metylalkohol

Ředí se purifikovanou vodou v poměru 1:10.

Postup barvení

Barvení je provedeno na principu Pappenheimovy metody panoptického barvení roztokem May-Grünwald a Giemsa-Romanowsky.

- Krevní nátěry jsou vloženy do barvicí kyvety s May-Grünwaldovým roztokem. Nechat barvit → 5 - 10 min.
- Oplach nátěru čistou vodou.
- Krevní nátěry jsou vloženy do barvicí kyvety s naředěným roztokem Giemsa-Romanowsky. Nechat barvit → 15 - 20 min.
- Oplach nátěru pod mírným proudem tekoucí vody a nechat ve stojanu na vzduchu volně oschnout. (Fátorová, 2016)

4.2 Hodnocení nátěrů periferní krve

Vlastní hodnocení této práce bylo provedeno na mikroskopech Olympus BX51 a BX43.

Nejprve jsem si při malém zvětšení (100-200x) našla optimální místo k počítání leukocytů a k hodnocení morfologie všech buněk. Následně jsem provedla mikroskopický rozpočet na 100 leukocytů imerzním objektivem při zvětšení 1000x. Jednotlivé buněčné populace jsem zaznamenávala pomocí hematologického sumátoru Eola. Preparát jsem prohlížela rovnoměrným meandrovitým pohybem objektivu. Tímto pohybem se zhodnotí celý nátěr ve vyhrazené oblasti krevního nátěru, kde nedochází k překrývání erytrocytů.

Roztříděná buněčná populace zahrnovala tyto buňky: **lymfocyty, monocyty, neutrofilní segmenty, eozinofily, neutrofilní tyče, bazofily, metamyelocyty a jaderné stíny.**

Ve druhém hodnocení krevního nátěru bylo úkolem roztřídit 100 nalezených lymfocytů do skupiny typických a atypických.

Do skupiny **typických** lymfocytů byl řazen typický malý a velký lymfocyt. (*viz kapitola 3.3 Vývoj lymfocytu*)

Do skupiny **atypických** lymfocytů byly řazeny lymfocyty se zářezy, se vzhledem prolymfocytů, větší elementy s jemnějším chromatinem, lymfoplazmocytoidní elementy či lymfocyty s členitým tvarem jádra.

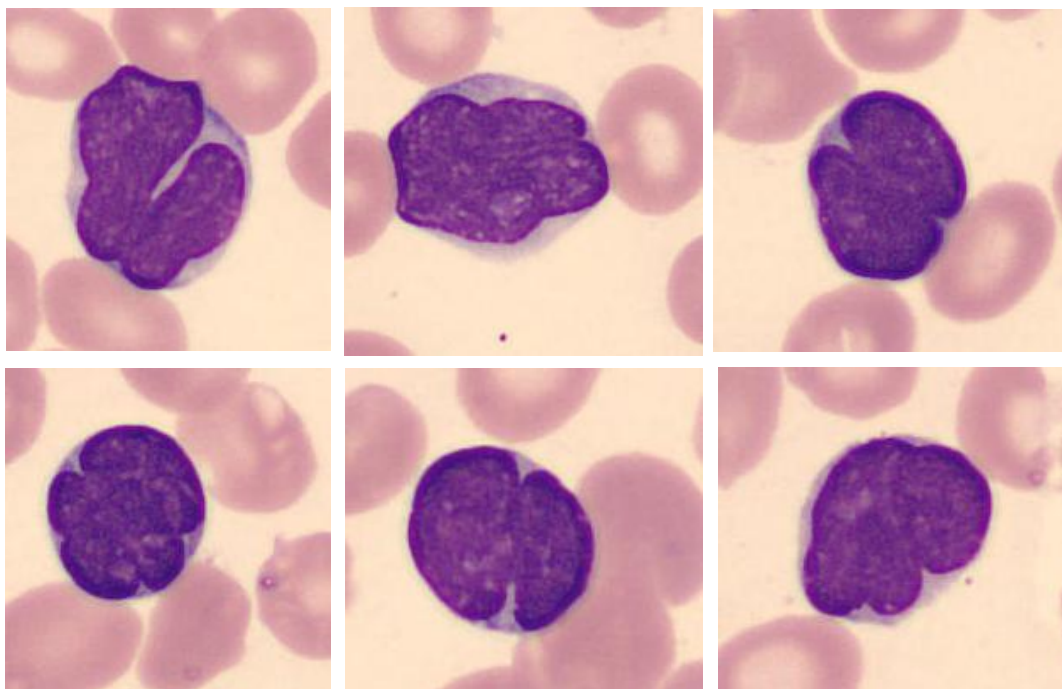
Prolymfocyty jsou buňky dvakrát až třikrát větší než je velikost červených krvinek. V kondenzovaném chromatinu jádra prolymfocytů se nachází centrálně uložené jádérko. Jádro obklopuje bohatší bazofilní cytoplazma. Jejich vzhled a velikost bývají heterogenní. K proměnlivosti může docházet v nukleo-cytoplazmatickém poměru, v nepravdělnosti tvaru prolymfocytu buňky, v síle kondenzace chromatinu a ve vzhledu jáderek.

Jaderné zářezy se vyskytovaly u dvou typů buněk: u **velkých atypických lymfocytů a malých lymfocytů.** Atypické lymfocyty jsou větší buňky, zhruba dvakrát větší než červené krvinky. Jejich velké jádro obsahuje jedno či více jáderek a je obklopeno bohatou bazofilní cytoplazmou. Často patrné jsou u atypických lymfocytů jaderné zářezy, které mohou být různé hloubky a velikosti.

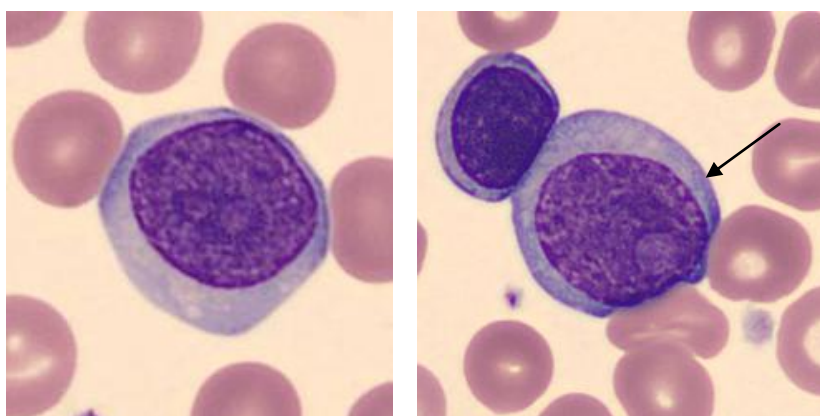
Jaderné stíny jsou prasklé buňky s rozrušenou jadernou membránou bez cytoplazmy.

4.3 Fotodokumentace buněk

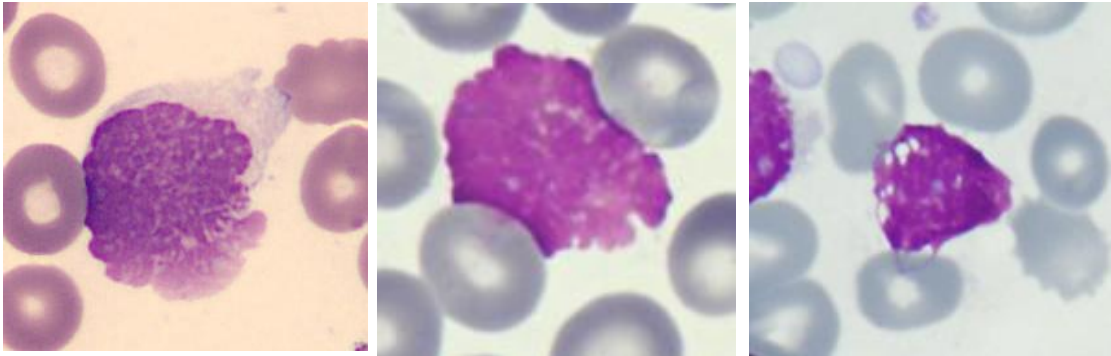
Obr. 8 a-f: Atypické lymfocyty se zářezem v jádře, členitějším tvarem jádra či jadérkem



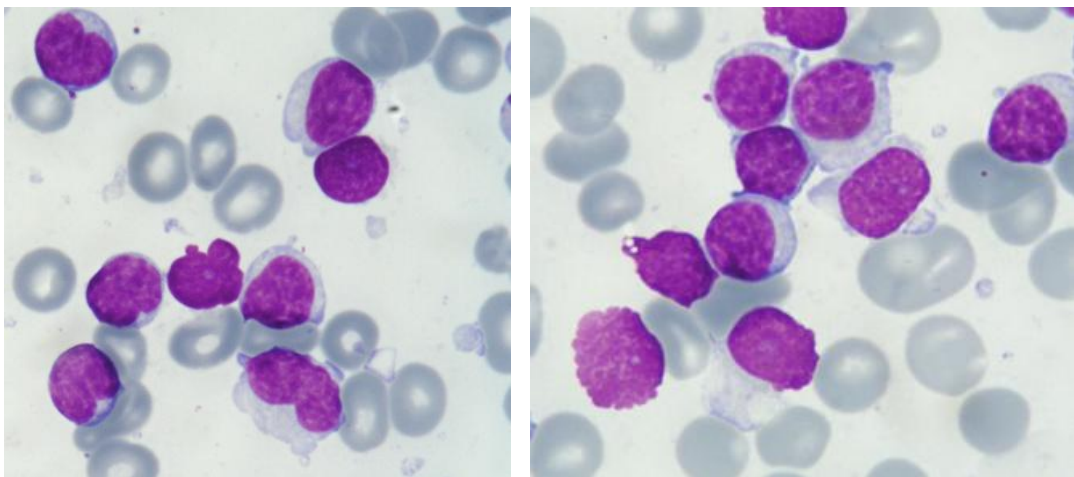
Obr. 9 a,b: Prolymfocyt



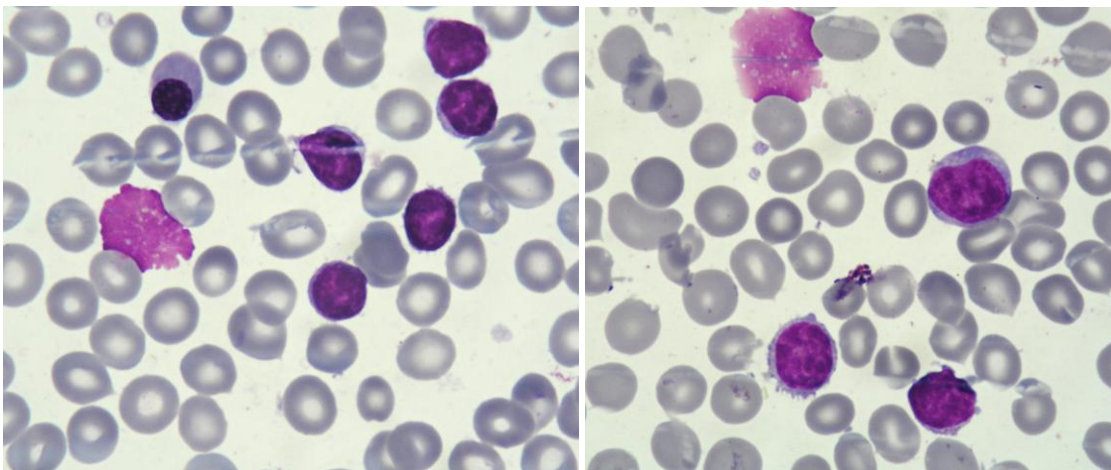
Obr. 10 a-c: Jaderné stíny



Obr. 11 a,b: Morfologický obraz CLL v periferní krvi, pleomorfní varianta



Obr. 12 a,b: Morfologický obraz CLL v periferní krvi, typická varianta



5 Statistické zhodnocení výsledků

Pro statistickou analýzu byly použity programy Microsoft Excel, Analyse It a MedCalc. Rozdíly mezi skupinami byly posouzeny pomocí neparametrického Mann-Whitneyova U testu vzhledem k tomu, že data neměla normální rozdělení. K posouzení korelace byl použit Spearmanův test. Pro zjištění vlivu atypické morfologie lymfocytů a jaderných stínů na období do léčby 1. linie (time to first-line treatment, TTFT) a celkového přežití (OS) pacientů s CLL byl použit log rank test a zkonstruovány křivky přežití podle Kaplan-Meiera. OS bylo definováno jako období od data diagnózy do úmrtí nebo poslední kontroly. TTFT bylo definováno jako období od data diagnózy do data zahájení léčby 1. linie. Hladina statistické významnosti (p) byla pro všechny testy stanovena na 0,05.

6 Výsledky

6.1 Charakteristika souboru pacientů

Prvním cílem této práce bylo sestavit soubor nátěrů periferní krve pacientů s chronickou lymfocytární leukémií v prvním záchytu nemoci.

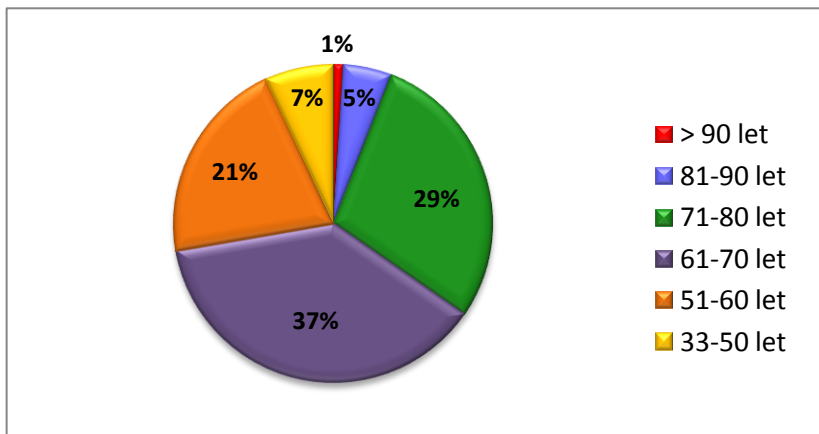
Byl vybrán soubor 101 pacientů s CLL, kteří byli diagnostikováni na IV. interní hematologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky byly sbírány v období 2010 až 2015. Základní demografické údaje jsou shrnuty v Tabulce 6. Soubor byl tvořen pacienty s mediánem věku 66 let (rozmezí 33 - 92 let), viz *Graf 1*. Zastoupení mužů a žen bylo 70 / 31, viz *Graf 2*. Pro rozlišení míry pokročilosti nemoci bylo uplatněno klinické stážování dle Raie. Zastoupení pacientů v klinických stádiích je uvedeno v Grafu 3.

Ve sledovaném období bylo k léčbě indikováno 39 pacientů a zemřelo celkem 11 pacientů.

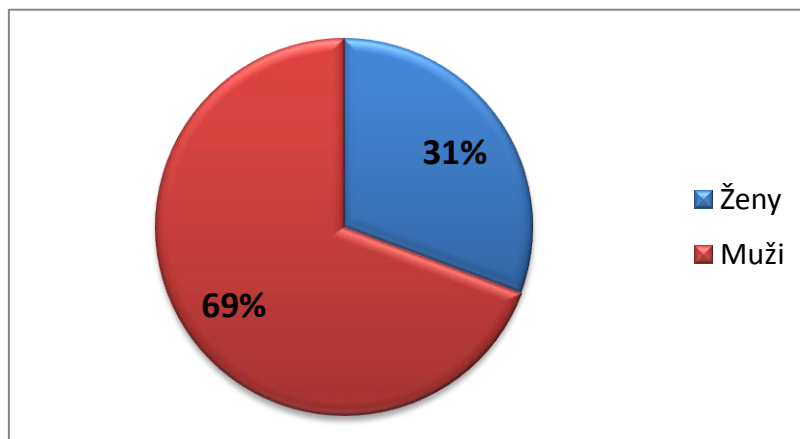
Tabulka 6 Charakteristika souboru pacientů

Charakteristika	N	%
Celkový počet nemocných	101	
Medián věku (rozmezí), roky	66 (33-92)	
Muži	70	69
Klinická stádia Rai 0/I/II/III/ IV	43/30/10/9/9	43/30/10/9/9
Medián počtu leukocytů (rozmezí), $\times 10^9/l$	22 (8-345)	
Nemutované IgV_H geny (n=48)	24	50
Delece 13q (n=54)	16	30
Delece 11q (n=54)	16	30
Delece 17p (n=54)	3	6
Trizomie 12 (n=54)	4	7
Atypické lymfocyty (medián, rozmezí), %	17 (2-61)	
Nemocní s atypickou CLL(cut-off 15 %)	59	58
Jaderné stíny (medián, rozmezí), %	22 (0-68)	
Nemocní se zvýšeným počtem jaderných stínů (cut-off 30 %)	33	33
Léčeno	39	39
Zemřelo	11	11

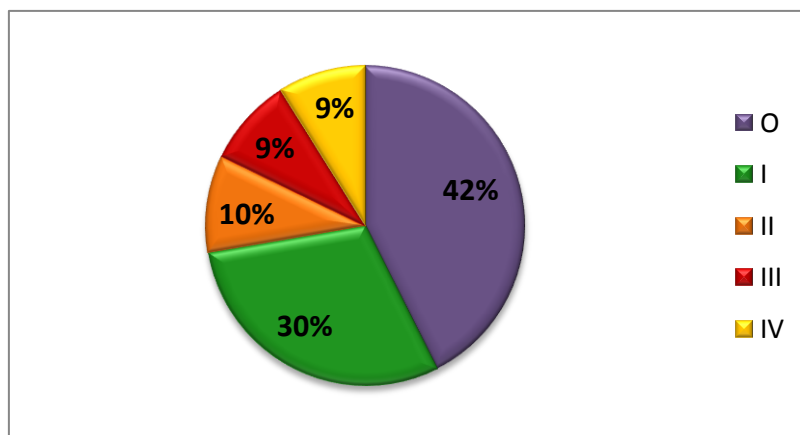
Graf 1: Věkové zastoupení



Graf 2: Zastoupení pohlaví. Poměr zastoupení mužů a žen byl 2,3 : 1.

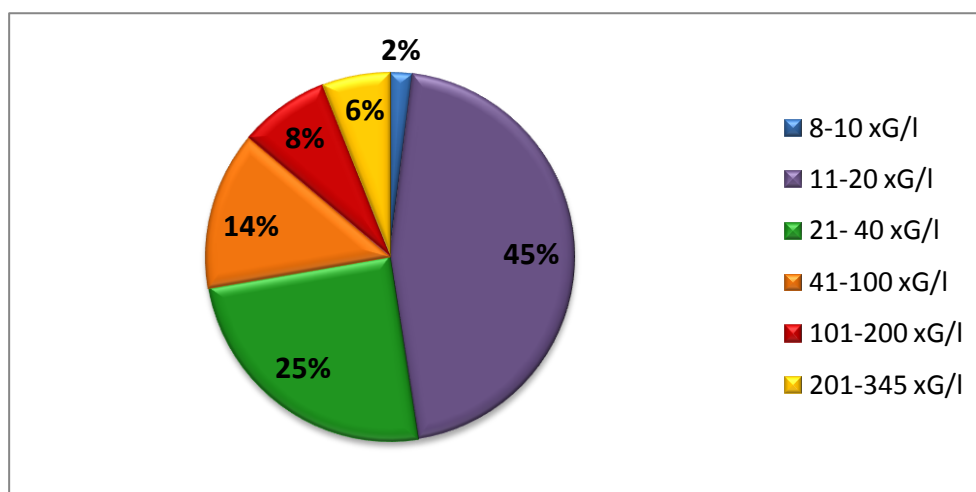


Graf 3: Zastoupení jednotlivých klinických stádií dle Raie u nově diagnostikovaných pacientů s CLL.



Z grafu je patrné, že většina nemocných je diagnostikována ve stádiích 0 a I.

Graf 4: Zastoupení počtu leukocytů v době diagnózy



Legenda: $G=10^9/l$

6.2 Stanovení mikroskopického rozpočtu leukocytů a zařazení lymfocytů

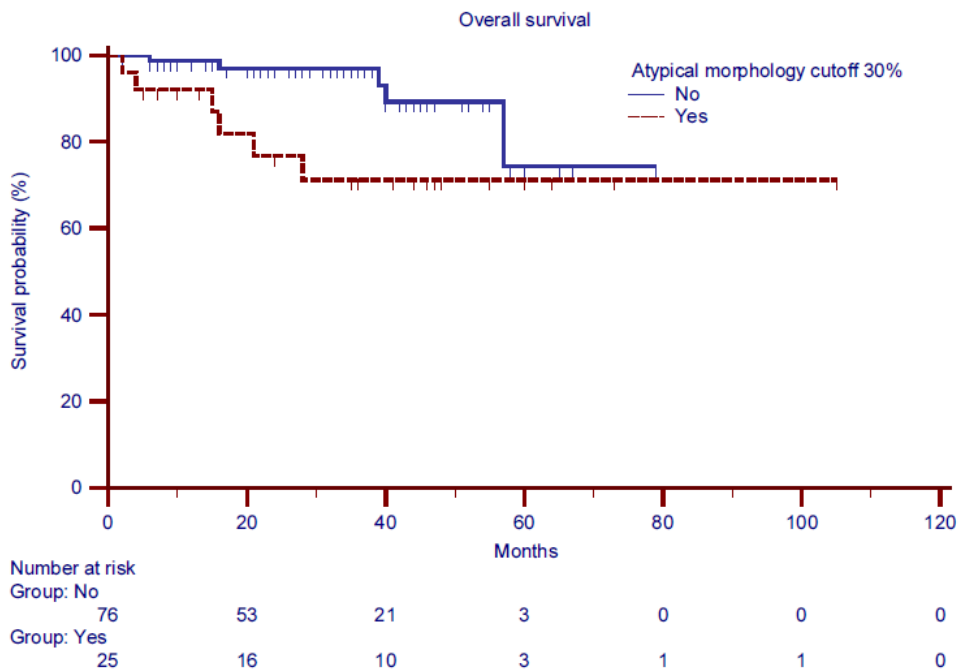
Druhým cílem této práce bylo provést mikroskopický rozpočet nátěrů periferní krve s CLL u 101 pacientů. Rozpočet leukocytů jsem počítala na 100 buněk leukocytární řady. Do diferenciálního rozpočtu byly zahrnuty i jaderné stíny. Následně byly nátěry periferní krve zhodnoceny podruhé s cílem roztrždit 100 lymfocytů na typické a atypické. Dosažené hodnoty shrnuje Tabulka 6. Obrázková příloha pozorovaných buněk je uvedena v kapitole 4.3 Fotodokumentace buněk.

6.3 Stanovení hraniční (cut-off) hodnoty pro aCLL a jaderné stíny

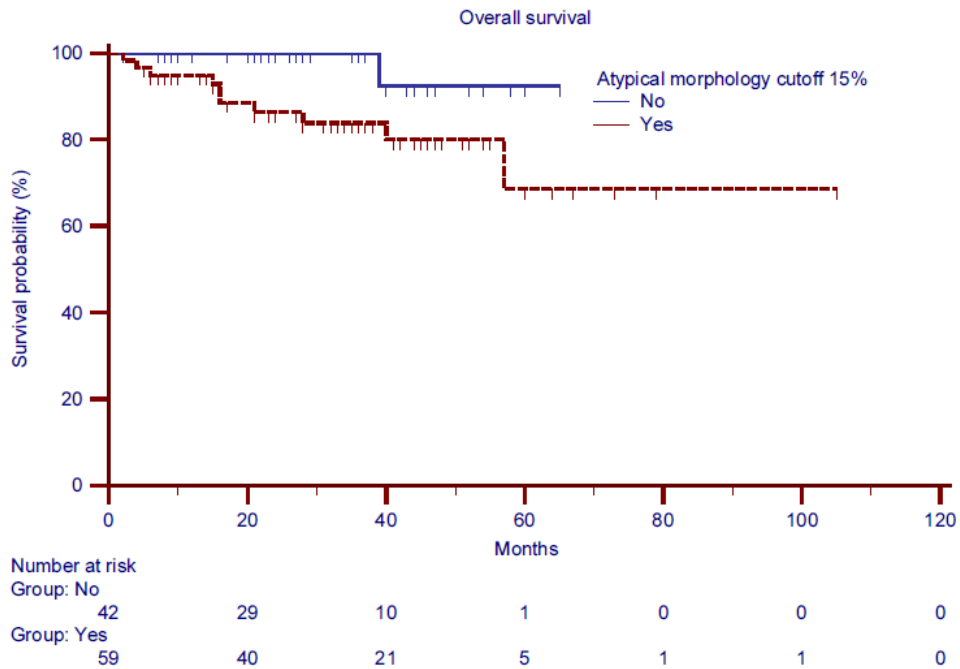
Pro stanovení cut-off hodnoty pro aCLL byla zkoumána hranice 15 % a 30 %. Z grafů uvedených v Obr. 13 a Obr. 14 vyplývá, že různá hranice neměla na oddělení skupin aCLL a tCLL dle celkového přežití podstatný vliv. Nemocní s atypickou CLL měli vždy významně kratší celkové přežití (mediány nedosaženy, $p=0,0397$, resp. $0,0299$). Zvolili jsme tedy pro další analýzy hranici 15 %, která je uvedena ve FAB klasifikaci (Bennett a kol, 1989). Atypická CLL dle cut-off 15 % byla zjištěna u 59 pacientů.

Hranici jaderných stínů (JS) $\geq 30\%$ jsme zvolili v souladu s průkopnickou prací kolektivu z Mayo Clinic. (Nowakowski a kol., 2007) Pacienty s $< 30\%$ jaderných stínů v krevním nátěru jsme označili jako JS negativní a pacienty s $\geq 30\%$ jaderných stínů jako JS pozitivní. JS pozitivní CLL se vyskytla u 33 ze 101 pacientů. Byl přítomen určitý trend ke kratšímu období do léčby 1. linie ($p=0,22$) a kratšímu celkovému přežití ($p=0,16$) u nemocných s nižším počtem JS viz Obr. 17 a viz Obr. 18.

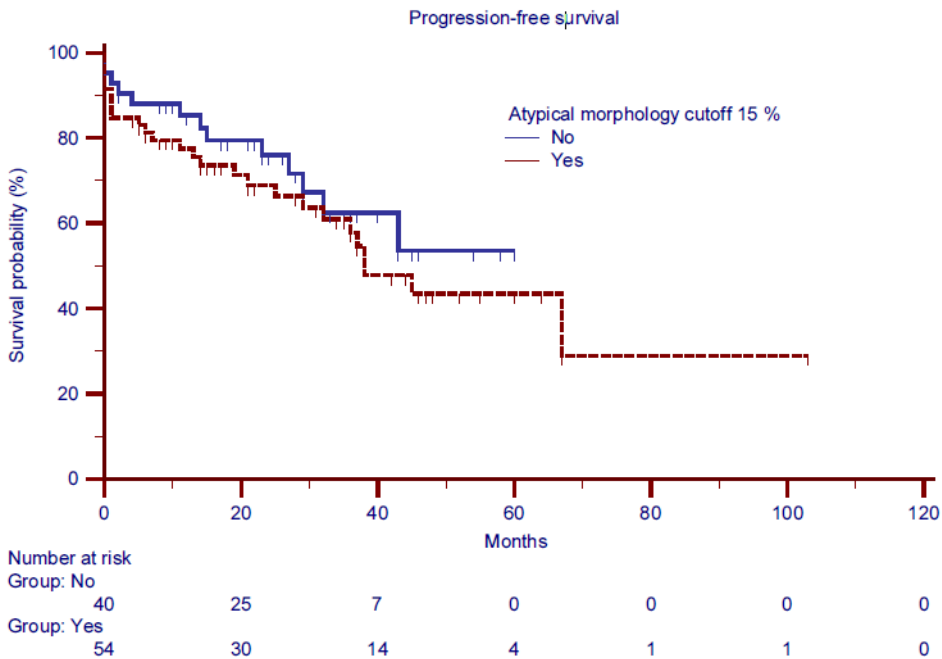
Obr. 13: Významně kratší celkové přežití nemocných s atypickou CLL při použití hranice 30 % ($p=0,0299$; HR=3,4; 95 % CI 0,9-13,1).



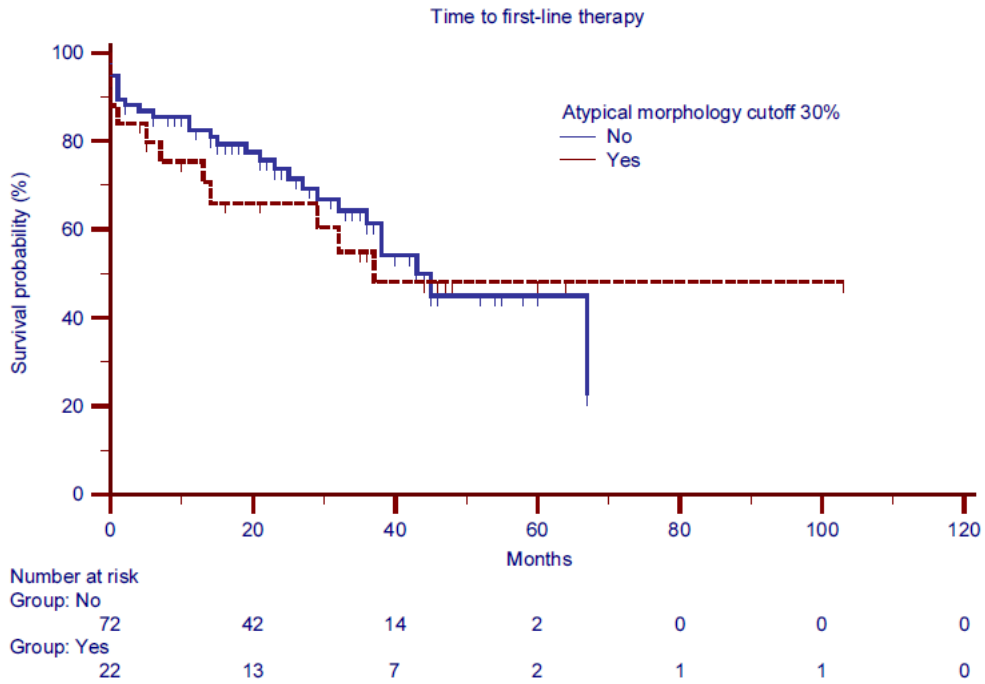
Obr. 14: Významně kratší celkové přežití nemocných s atypickou CLL při použití hranice 15 %. Medián nedosažen v žádné ze skupin ($p=0,0397$; $HR=6,46$; 95 % CI 1,93-21,67).



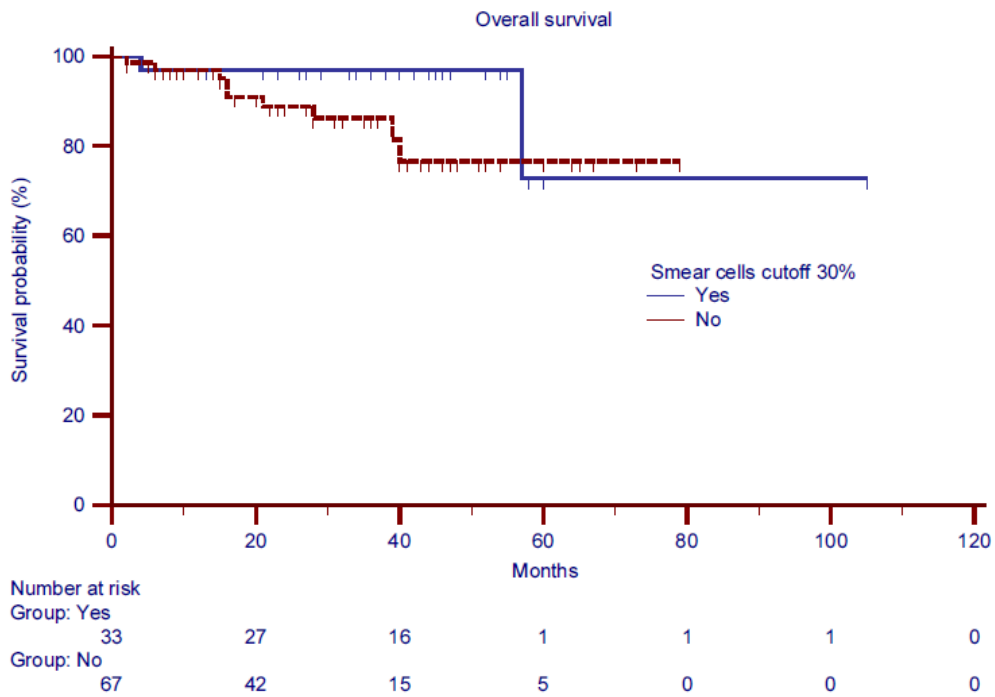
Obr. 15: Období do léčby 1. linie není významně rozdílné mezi tCLL a aCLL při použití hranice 15 % ($p=0,394$; $HR=1,33$; 95 % CI 0,7-2,5).



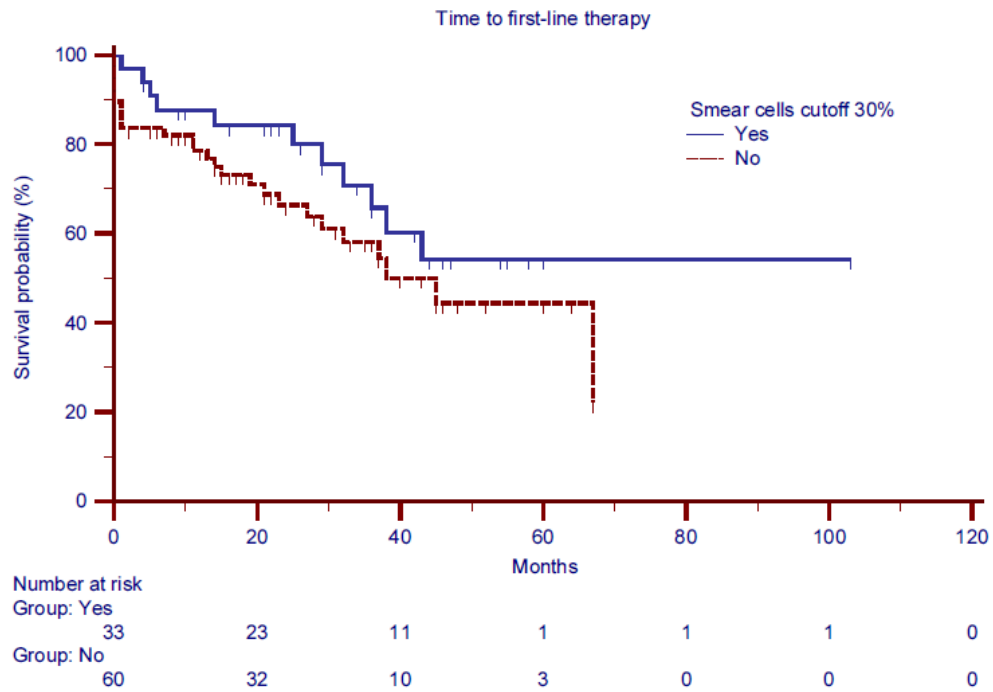
Obr. 16: Období do léčby 1. linie není významně rozdílné mezi tCLL a aCLL při nastavení hranice 30 % ($p=0,716$; $HR=1,14$; 95 % CI 0,55-2,33).



Obr. 17: Trend k delšímu celkovému přežití nemocných s vysokým počtem jaderných stínů při hranici 30 % (mediány nedosaženy, $p=0,16$; $HR=2,8$; 95 % CI 0,84-9,5).



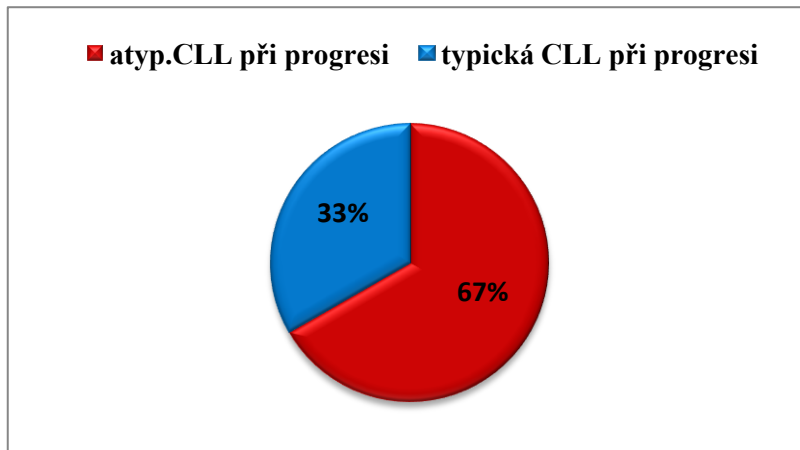
Obr. 18: Trend k delšímu období do léčby 1. linie u nemocných s vysokým počtem jaderných stínů při hranici 30 % (medián nedosažen vs. 38 měsíců, $p=0,22$; $HR=1,5$; 95% CI 0,8-2,96).



6.4 Porovnání prognostických markerů

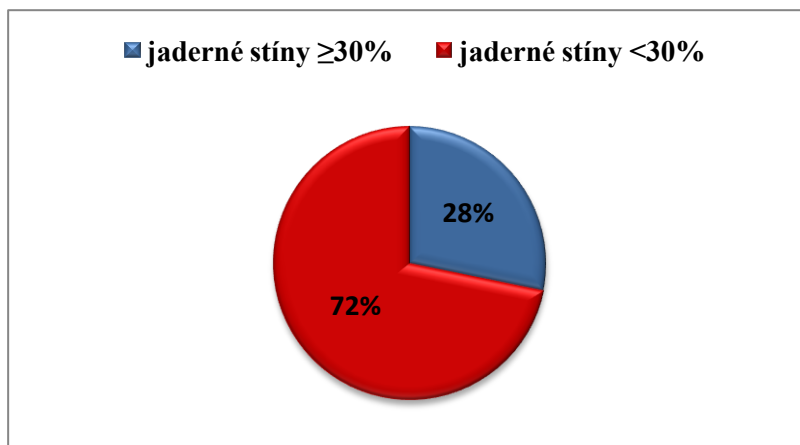
6.4.1 Porovnání aCLL a jaderných stínů s klasickými prognostickými faktory

Graf 5: Srovnání atypické a typické CLL v období progresse nemoci



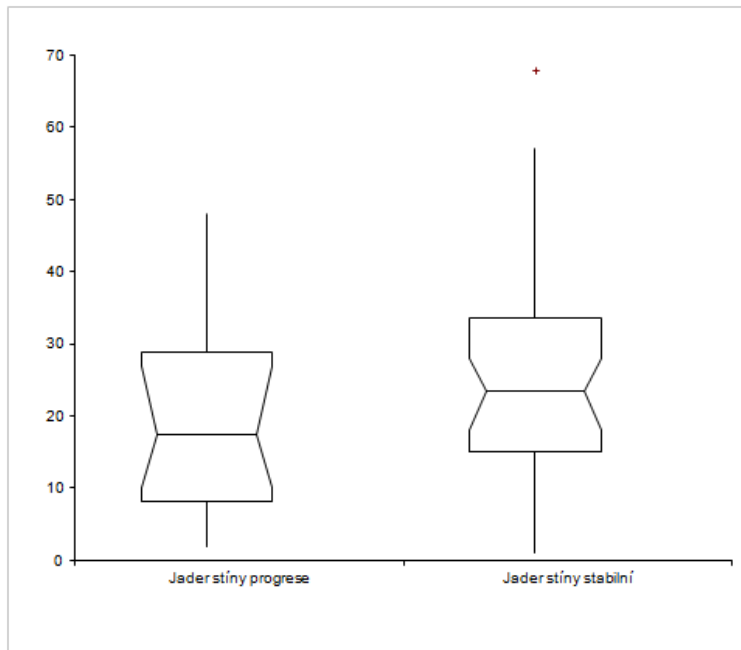
Progresi k léčbě mělo 39 pacientů. Z nich mělo atypickou CLL 26 pacientů (67 %) a typickou CLL 13 pacientů (33 %). Z grafu vyplývá tendence aCLL k progresivnímu průběhu. Mann-Whitney U testem však nebyla prokázána signifikantní korelace mezi atypickou CLL a progresí nemoci ($p=0,973$).

Graf 6: Porovnání počtu jaderných stínů k progresi nemoci



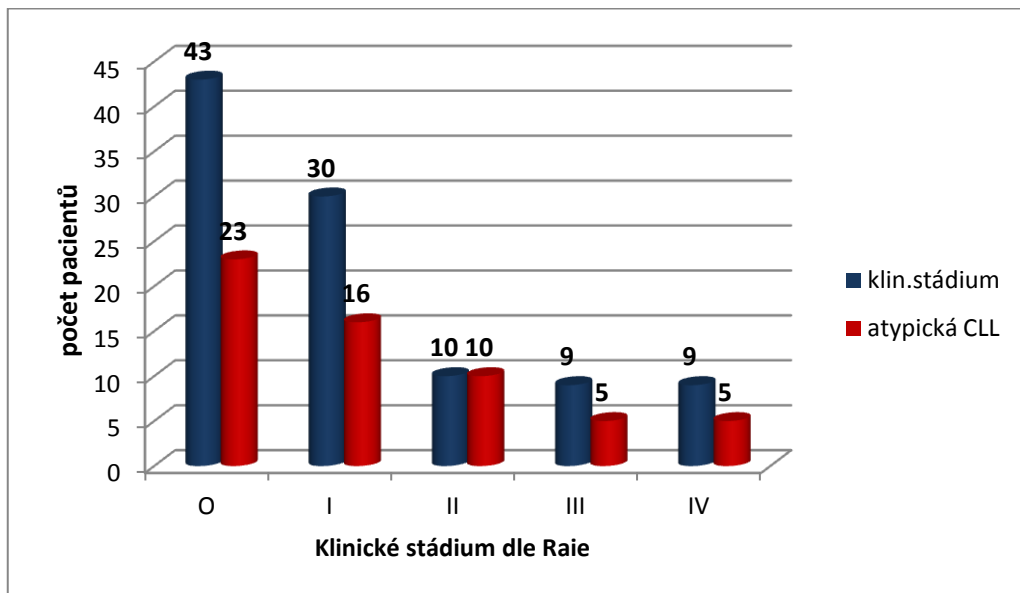
Více než 30 % JS mělo ve vztahu k progresi nemoci 11 pacientů (28 %). Z grafu můžeme usuzovat na tendenci k progresi u nemocných s JS-negativní CLL. Mann-Whitney U test však neprokázal významnou korelaci mezi jadernými stíny a progresí nemoci ($p=0,149$).

Obr. 19: Krabičkový graf vztahu mezi počtem jaderných stínů a progresí CLL



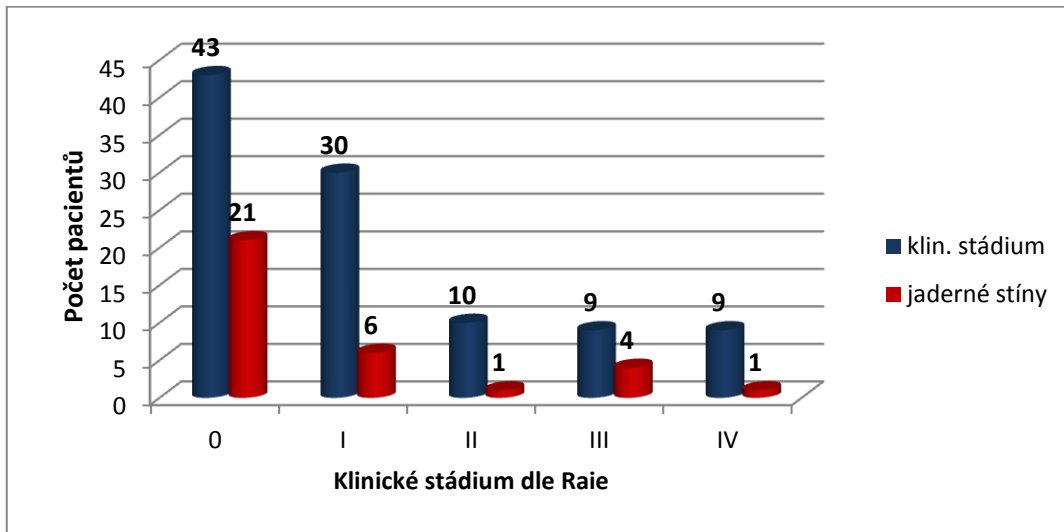
Nemocní s progresivní CLL měli trend k nižšímu počtu JS (medián 17,5 vs 23,5 %, $p=0,149$).

Graf 7: Porovnání klinického stádia a zastoupení atypické CLL



Z grafu není patrná zjevná asociace mezi aCLL a klinickými stádii dle Raie. Také porovnání počtu atypických lymfocytů ve skupinách dle klinického stádia pomocí Mann-Whitneyova U testu ukázalo, že rozdíly nejsou statisticky významné ($p=0,201$).

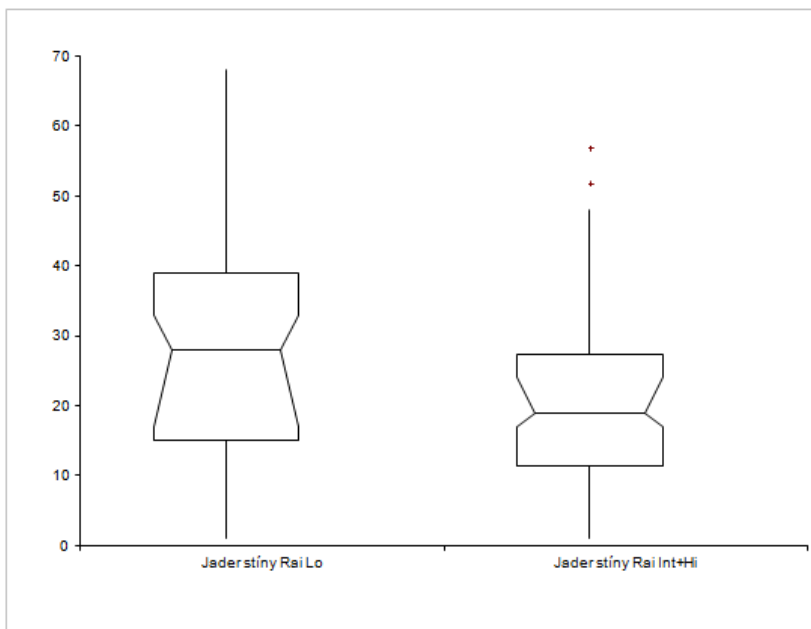
Graf 8 Porovnání klinického stádia a jaderných stínů s hranicí 30%



Z grafu je patrné největší zastoupení pacientů JS pozitivních v časném klinickém stádiu 0.

Mann-Whitney U test prokázal korelaci mezi počtem jaderných stínů a časným klinickým stádiem 0 dle Raie ($p=0,039$).

Obr. 20: Krabičkový graf vztahu mezi jadernými stíny a klinickými stádii



Nemocní diagnostikovaní v klinickém stádiu Rai 0 měli významně vyšší počet JS v porovnání s ostatními stádii (medián 28 vs 19 %, $p=0,0389$).

Mann-Whitney U testem nebyla prokázána asociace mezi pohlavím a atypickou CLL ($p=0,258$) či počtem jaderných stínů ($p=0,952$).

Spearmanovým korelačním koeficientem jsme neprokázali souvislost mezi počtem leukocytů a počtem atypických lymfocytů ($r=0,04$; $p=0,722$) a ani počtem jaderných stínů ($r=0,12$; $p=0,239$). Spearmanovým korelačním koeficientem také nebyl prokázán významný vztah mezi počtem jaderných stínů a atypickou CLL ($r=0,08$; $p=0,408$).

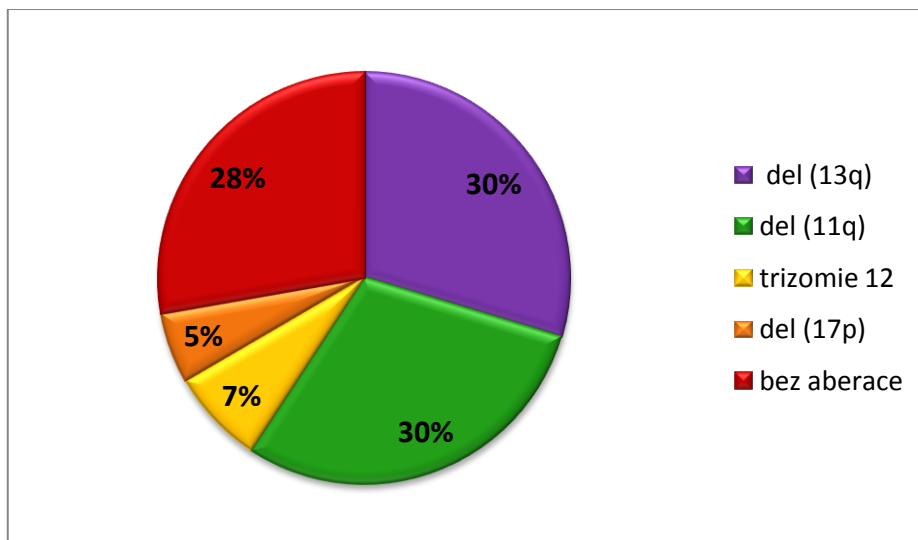
Z těchto výsledků vyplývá, že počet atypických lymfocytů ani jaderných stínů není přímým ukazatelem velikosti nádorové nálože u CLL.

6.4.2 Porovnání vztahu jaderných stínů a atypické morfologie k moderním prognostickým faktorům - mutačnímu stavu IgV_H a cytogenetickým abnormalitám

Mutační stav genu pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu byl vyšetřen u 48 pacientů. Mutovaný stav IgV_H byl zjištěn u 24 pacientů (50 %). Mann-Whitney U test neprokázal vliv mutačního stavu IgV_H na počet jaderných stínů ($p=0,841$) ani počet atypických lymfocytů ($p=0,211$).

Cytogenetické aberace byly vyšetřeny u 54 pacientů metodou FISH. Negativní nález byl u 15 pacientů. Zastoupení pacientů dle aberace vyjadřuje Graf 9.

Graf 9 Cytogenetické aberace dle FISH



Nejčastějšími aberacemi v souladu s literaturou byly delece 13q a delece 11q. Na základě Döhnerovy hierarchické klasifikace (Döhner a kol., 2000) jsme nemocné rozdělili na podskupinu s příznivou prognózou (del 13q a negativní nález, n=31) a podskupinu s nepříznivou prognózou (del 11q a del 17p, n=19). Mann-Whitneův U test neprokázal vliv cytogenetických aberací na počet jaderných stínů ($p=0,6$) ani počet atypických lymfocytů ($p=0,435$).

7 Diskuze

V této práci jsme hodnotili význam atypické morfologie a počtu jaderných stínů u nemocných s neléčenou chronickou lymfocytární leukémií. Vyšetřovaný soubor 101 nemocných odpovídal z hlediska demografických údajů a zastoupení prognostických faktorů běžné CLL populaci. Medián věku činil 66 let, což je hodnota blízká uváděnému věku v epidemiologických studiích - například Doubek uvádí ve svém souboru pacientů medián 65 let. (Doubek a kol., 2010) Taktéž v souladu s literaturou (Brejcha a kol., 2010) byli pacienti v našem souboru nejčastěji diagnostikováni v časném klinickém stádiu Rai 0 (43 % pacientů).

Moderní prognostické faktory (mutační stav IgV_H , cytogenetické aberace) byly vyšetřeny pouze u zhruba poloviny nemocných, což je o něco méně než odpovídá běžné praxi a vychází z vysoké ceny těchto vyšetření. (Brejcha a kol., 2010) Stanovení mutačního stavu IgV_H není dosud považováno za standardní prognostický ukazatel pro běžnou praxi a je doporučován spíše u mladších nemocných. Stejně tak cytogenetické aberace má význam vyšetřovat pouze u mladších nemocných, u kterých výsledek ovlivní další léčebné rozhodování. (Smolej a kol., 2013) Dalším faktorem, který hrál roli v relativně nízkém počtu nemocných se známým výsledkem mutačního stavu IgV_H a FISH je krátké období od diagnózy CLL, kdy výsledky těchto vyšetření ještě nebyly k dispozici. Nemutované IgV_H geny mělo 50 % nemocných a nejčastějšími cytogenetickými aberacemi byly del 13q a del 11q (shodně 30 %), což je opět v souladu s literaturou týkající se nově diagnostikovaných nemocných. (Brejcha a kol., 2010)

Morfologické zhodnocení krevního nátěru je první krok v diagnostice chronické lymfocytární leukémie. Morfologická analýza je rychlá, levná a efektivní metoda. Již roku 1989 byla CLL rozdělena FAB klasifikací podle morfologie lymfocytů do typické a atypické podskupiny. (Bennett a kol., 1989) Vliv atypické morfologie buněk na prognózu CLL a její korelaci s dalšími významnými prognostickými markery je předmětem diskuzí. Morfologickou významnost atypických lymfocytů na prognózu CLL potvrzují ve své studii Criel a kol. (1999). Ve své studii prokázali, že atypická CLL je progresivnější onemocnění, vyskytuje se ve více pokročilém klinickém stádiu, vyžaduje dřívější léčbu a má významně kratší dobu přežití. Dále prokázali asociaci mezi aCLL a častější expresí aberantního imunofenotypu a chromosomových abnormalit, zejména trizomii 12. (Criel a kol., 1999)

Při nastavení hranice pro atypickou CLL jsme vycházeli z FAB klasifikace (Bennett a kol., 1989), která udává hranici 15 %, testovali jsme však také hranici 30 %. Vzhledem k tomu, že obě uvedené hranice vykázaly obdobné výsledky při hodnocení celkového přežití (nejvýznamnějšího klinického parametru), použili jsme pro další statistické analýzy hranici 15 %. Ideální metodou nastavení hranice by bylo použití ROC (receiver operating curve) analýzy, kterou však z časových důvodů nebylo možné provést, plánujeme to však v rámci pokračování projektu.

Atypickou CLL jsme klasifikovali u 59 pacientů. Naše výsledky je obtížné porovnat s ostatními studiemi, kvůli rozdílným kritériím pro morfologickou klasifikaci; tématu morfologicky atypické CLL bylo také dosud věnováno minimální množství publikací. Recentní práce z roku 2013 autorů Marionneaux a kol. se zabývá morfologickou identifikací atypické CLL pomocí digitální mikroskopie u 97 nemocných. Ve své práci uvádějí 27 % pacientů s aCLL. Tento rozdíl je dán následnými odlišnými kritérii pro morfologickou klasifikaci CLL. Typická CLL je tvořena > 90 % lymfocytů malé až střední velikosti s relativně normální morfologií a < 10 % cirkulujících prolymfocytů. Do atypické CLL je řazena: CLL/PL (tvořena malými lymfocyty a 10-55 % prolymfocyty) a smíšený buněčný typ (tvořen >15 % lymfoplasmocytoidními buňkami, buňkami se zářezy a < 10 % prolymfocytů).

Autoři zkoumali také vztah mezi aCLL s ostatními prognostickými markery. Ve své studii prezentovali vyšší výskyt nemutovaného IgV_H genu a nižší výskyt delece 13q u aCLL v porovnání s tCLL. Stejně jako v naší studii, je i v této studii málo pozitivních pacientů na deleci 17p a 11q, a proto nejsou tyto výsledky statisticky signifikantní. (Marionneaux a kol., 2014)

V literatuře se uvádí asociace atypické CLL s vyšší prevalencí markerů s horší prognózou. Mezi tyto markery se řadí trizomie 12, delece 17p, delece 11q a nemutovaný IgV_H gen. (Criel a kol., 1997; Lens a kol., 1997; Schwarz a kol., 2006) Delece chromosomu 13q je spojována s příznivou prognózou a vyskytuje se u pacientů s typickou morfologií CLL. (Bigoni a kol., 1997; Cuneo a kol., 1997) Do nepříznivých cytogenetických aberací jsme tedy zařadili deleci 17p a 11q, do příznivých deleci 13q a negativní nález. Trizomie 12 byla vyčleněna vzhledem k nejistému prognostickému významu. Korelace mezi aCLL a cytogenetikou nebyla ($p=0,435$). Tyto výsledky byly jistě ovlivněny malým počtem nemocných s dostupnými výsledky FISH a IgV_H.

Mann-Whitney testem jsme hodnotili závislost počtu atypických lymfocytů a mutačního stavu IgV_H. Hypotéza, že aCLL bude korelovat s nemutovaným IgV_H genem

se nepotvrdila ($p=0,211$). Touto problematikou se zabývali Schwarz a kolektiv. Ve své studii prokázali statisticky významný vztah mezi aCLL a nemutovaných IgV_H genem. Příčinou rozdílu vůči naší studii by mohla být odlišná definice atypické CLL (nebyla nastavena jednotná hranice počtu atypických lymfocytů). (Schwarz a kol., 2006)

Neprokázali jsme také hypotézu, že aCLL bude souviset s pokročilým klinickým stádiem ($p=0,201$).

Zkoumali jsme také vztah mezi aCLL v závislosti na pohlaví. Korelace nebyla prokázána ($p=0,258$). U chronické lymfocytární leukémie jsou muži postiženi téměř dvakrát častěji než ženy. (Redaelli a kol., 2004) Avšak většina studií nepotvrzuje mužské pohlaví jako nepříznivý prognostický faktor pro přežití. Kratší dožití u mužů s CLL může být vysvětleno obecně jejich kratší průměrnou délkou přežití v populaci. Významnou roli v délce dožití u CLL hraje i fakt, že medián věku přežití je nad 60 let. (Bosch a kol., 2002; Pflug a kol., 2014)

Neprokázali jsme hypotézu, že aCLL bude spojena s progresí nemoci ($p=0,973$). I přes neprokázaný statisticky významný rozdíl, můžeme v Graf 5 vidět větší zastoupení aCLL k progresi nemoci. Vztah mezi aCLL a progresí nemoci je zmíněn již v původním článku FAB skupiny z roku 1989. (Bennett, 1989) Taktéž nejčastěji citovaná práce Criel a kol. z roku 1999 potvrzuje asociaci aCLL s progresí nemoci. (Criel a kol., 1999)

Spearmanovým korelačním koeficientem jsme posuzovali možnou souvislost mezi počtem leukocytů a počtem atypických lymfocytů. Korelace mezi těmito skupinami nebyla prokázána ($p=0,723$, $r=0,04$), což dokládá, že počet atypických lymfocytů není pouhým odrazem velikosti nádorové masy u CLL.

V krevních nátěrech prakticky všech CLL pacientů jsou přítomné jaderné stíny. Jaderné stíny neboli historicky Gumprechtovy stíny jsou rozpadlé leukemické lymfocyty, což je artefakt vzniklý při provádění nátěru periferní krve či kostní dřeni. (Gumprecht, 1896; Macdonald a kol., 2003) V nedávné době se zjišťuje jejich spojitost s cytoskeletárním proteinem vimentinem. (Nowakowski a kol., 2005) Vysoká exprese vimentinu je spojována se špatnou prognózou CLL. Prokázala se korelace mezi nízkou expresí vimentinu a vysokým procentem jaderných stínů. (Brown a kol., 2001)

Hranici hodnoty jaderných stínů jsme zvolili 30 % na základě průkopnické práce autorů z Mayo Clinic. (Nowakowski a kol., 2007) Zavedená cut-off hodnota 30 % se ukázala být stratifikační hodnotou i v nezávislé a později publikované práci autorů Nowakowski a kol. z roku 2009. (Nowakowski a kol., 2009) Medián počtu jaderných

stínů činil v našem souboru 22 % (rozmezí 0-68 %), což je v dobrém souladu s prací Nowakowski a kol. - ti uvádí medián 28 % (rozmezí 1-75 %) v souboru 108 pacientů. (Nowakowski a kol., 2009) Naše výsledky jsou také téměř shodné s prací autorů Johansson kol. z roku 2010, kteří uvádí medián 21 % (rozmezí 0-70 %) v kohortě 100 pacientů. Johansson a kol. porovnávali výsledky cutoff hodnoty 30 % dle práce Nowakowski a kol. a 20 % na základě ROC analýzy. Podle 30 % cutoff hodnoty jaderných stínů určili 26 % pacientů jako jadernými stíny pozitivní. Podle hranice 20 % určili 54 % pacientů jako jadernými stíny pozitivní. Z toho vyplývá, že hranice 20 % rozdělila jejich kohortu na téměř dvě stejně velké skupiny v porovnání s 30 % cutoff hodnotou. Definice ideální cut-off hodnoty, je důležitá pro maximální prognostický / prediktivní vliv hodnocených ukazatelů. V práci Johansson a kol. je použita manuální metoda přípravy krevních nátěrů stejně jako v naší, zatímco v práci Nowakowski a kol. je použito polo-automatizované zařízení. I přesto, že manuální technika je limitována nedostatečnou standardizací, tak v porovnání s automaticky připravenými nátěry je patrná její výhoda, kdy snižuje výskyt jaderných stínů v důsledku menšího tlaku na podložní sklíčko. (Johansson a kol., 2010)

Prokázali jsme signifikantní souvislost mezi počtem jaderných stínů a časným klinickým stádiem 0 dle Raie ($p=0,04$).

V naší práci nebyl prokázán vztah mezi procentuálním zastoupením jaderných stínů a mutovaným IgV_H genem ($p=0,841$), pohlavím ($p=0,952$), cytogenetickými aberacemi ($p=0,435$). Dále nebyla prokázána korelace mezi počtem jaderných stínů a počtem leukocytů ($r=0,12$, $p=0,239$). V práci autorů Nowakowski a kol. z roku 2009 nebyla prokázána významná korelace mezi počtem jaderných stínů a klinickým stádiem dle Raie nebo cytogenetickými abnormalitami ($del 11q,17p$) a mutovaným IgV_H genem. Pacienti s delecí 13q jako jedinou genetickou abnormalitou měli v jejich práci vyšší procentuální zastoupení jaderných stínů ($p=0,036$). Naopak v průkopnické práci z roku 2007 autoři Nowakowski a kol. demonstrují, že procento jaderných stínů u pacientů s nemutovaným IgV_H genem je nižší. Ke stejným výsledkům došli Johansson a kol. (Johansson a kol., 2010; Nowakowski a kol., 2007; Nowakowski a kol., 2009)

Nemocní s nízkým počtem jaderných stínů měli kratší období do léčby 1. linie (medián 38 měsíců vs. nedosažen), rozdíl však nebyl statisticky významný ($p=0,22$). Byl přítomen určitý trend ke kratšímu přežití nemocných s nižším počtem jaderných stínů (mediány nedosaženy v obou skupinách, $p=0,16$). Na tyto výsledky naší analýzy má jistě vliv krátké sledování nemocných (medián 32,5 měsíce), což je spojeno s dosud

poměrně malým počtem progresí (n=39), tak zejména úmrtí (n=11). Data uváděná literaturou ukazují na delší přežití u pacientů s vyšším počtem jaderných stínů. Nowakowski a kol. ve své práci demonstrují 10-leté přežití 50 % pacientů s méně než 30 % jaderných stínů v porovnání s 80 % pacientů s více než 30 % jaderných stínů (p=0,015). V recentní práci autoři Gogia a kol. uvádí 5-leté přežití 51 % pacientů s méně než 30 % jaderných stínů ve srovnání s 81 % pacientů s ≥ 30 % jaderných stínů (p< 0,001). (Gogia a kol., 2014)

8 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo posoudit prognostický význam atypické morfologie buněk a jaderných stínů u chronické lymfocytární leukémie. Atypická CLL byla při nastavení hranice 15 % zjištěna u 59 % nemocných s CLL. Pozitivitu jaderných stínů při nastavené hranici 30 % mělo 33 % nemocných.

Z hlediska atypické morfologie CLL jsme nepotvrdili významnou spojitost s klasickými či moderními prognostickými ukazateli ani obdobím do léčby 1. linie. Nemocní s atypickou CLL však měli významně kratší celkové přežití.

Co se týče problematiky jaderných stínů u CLL, prokázali jsme spojitost vyššího zastoupení JS a časného klinického stádia dle Raie. Nebyla prokázána asociace JS s dalšími prognostickými faktory. Nemocní s pozitivitou JS měli tendenci k delšímu období do léčby 1. linie i celkovému přežití.

Lze tedy uzavřít, že tato práce podporuje hypotézu o nepříznivém prognostickém vlivu atypické morfologie a nižšího zastoupení jaderných stínů u chronické lymfocytární leukémie. Oba parametry představují velmi levné, jednoduché a dobře dostupné vyšetření oproti jiným novým biologickým prognostickým markerům, což je jejich nepochybnou výhodou. Pro použití v rutinní praxi bude nutno naše výsledky týkající se jaderných stínů a atypické morfologie u CLL potvrdit na větším souboru nemocných s vyšším počtem vyšetřených moderních prognostických faktorů a delší dobou sledování, aby bylo možno provést ROC analýzy k ideálnímu nastavení hranic pro oba zmiňované parametry a jednoznačně posoudit jejich prognostický význam.

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Imunofenotypizační skórovací systém CLL dle Royal Marsden	19
Tabulka 2: Klinické stážování dle Raie	21
Tabulka 3: Klinické stážování dle Bineta	21
Tabulka 4: Prognóza pacientů s různými cytogenetickými změnami	23
Tabulka 5: Shrnutí indikací k léčbě na základě kritérií IWCLL.....	29
Tabulka 6: Charakteristika souboru pacientů	42

10 Seznam obrázků

Obr. 1: Vliv rozhodujících faktorů na prognózu pacienta	20
Obr. 2: Lymfoblast.....	31
Obr. 3: Prolymfocyt	31
Obr. 4: Malý lymfocyt	32
Obr. 5: Velký lymfocyt	32
Obr. 6: Zhotovení krevního nátěru	33
Obr. 7: Meandrovitý způsob prohlížení nátěru	34
Obr. 8 a-f: Atypické lymfocyty se zářezem v jádře, členitějším tvarem jádra či jadérkem	38
Obr. 9 a,b: Prolymfocyt	38
Obr. 10 a-c: Jaderné stíny	39
Obr. 11 a,b: Morfologický obraz CLL v periferní krvi, pleomorfní varianta.....	39
Obr. 12 a,b: Morfologický obraz CLL v periferní krvi, typická varianta.....	39
Obr. 13: Významně kratší OS nemocných s atypickou CLL při použití hranice 30 %..	45
Obr. 14: Významně kratší OS nemocných s atypickou CLL při použití hranice 15 %..	46
Obr. 15: TTFT není významně rozdílné mezi tCLL a aCLL při použití hranice 15 %..	46
Obr. 16: TTFT není významně rozdílné mezi tCLL a aCLL při nastavení hranice 30 %	47
Obr. 17: Trend k delšímu OS nemocných s vysokým počtem JS při hranici 30 %	47
Obr. 18: Trend k delšímu TTFT u nemocných s vysokým počtem JS při hranici 30 %	48
Obr. 19: Krabičkový graf vztahu mezi počtem jaderných stínů a progresí CLL.....	50
Obr. 20: Krabičkový graf vztahu mezi jadernými stíny a klinickými stádii.....	51

11 Seznam grafů

Graf 1: Věkové zastoupení	43
Graf 2: Zastoupení pohlaví	43
Graf 3: Zastoupení klinických stádií dle Raie.....	43
Graf 4: Zastoupení počtu leukocytů v době diagnózy	44
Graf 5: Srovnání atypické a typické CLL v období progresu nemoci.	49
Graf 6: Porovnání počtu jaderných stínů k progresu nemoci	49
Graf 7: Porovnání klinického stádia a zastoupení atypické CLL	50
Graf 8: Porovnání klinického stádia a jaderných stínů s hranicí 30 %	51
Graf 9: Cytogenetické aberace dle FISH	53

12 Seznam použité literatury

- 1) Adam Zdeněk a kol. Hematologie: Přehled maligních hematologických nemocí. 2. doplněné a zcela přepracované vydání. Grada Publishing, 2008, 404 s. ISBN 978-80-247-2502-4.
- 2) Aisenberg AC, Bloch KJ. Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. *N Engl J Med* 1972; 287: 272-276.
- 3) Bain BJ, Clark DM, Lampert IA. Bone Marrow Pathology. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1992; 264.
- 4) Bennett JH. Two cases of disease and enlargement of the spleen, in which death took place from presence of purulent matter in the blood. *Edinb Med Surg J* 1845; 64: 413-423.
- 5) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1989; 42: 567-584.
- 6) Bergmann MA, Eichhorst BF, Busch R, a kol. Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): Results of the CLL-1

protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). ASH Annual Meeting Abstracts 2007; 110: 625.

7) Bigoni R, Cuneo A, Roberti MG, Bardi A, a kol. Chromosome aberrations in atypical chronic lymphocytic leukemia: a cytogenetic and interphase cytogenetic study. *Leukemia* 1997; 11: 1933-1940.

8) Binet JL, Auquier A, Dighiero G, a kol. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.

9) Bosch F, Montserrat E. Refining prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2002; 6(4): 335-349; discussion 449-450.

10) Břejcha M., Doubek M., Cmunt E., Schwarz J. a kol. Nové prognostické markery u chronické lymfocytární leukemie v každodenní hematologické praxi. Analýza dat ze čtyř pracovišť. *Transfúze a Hematologie dnes.* 2010; 16(1): 62-66.

11) Brown MJ, Hallam JA, Colucci-Guyon E, a kol. Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J Immunol.* 2001; 166: 6640-6646.

12) Burger JA, Keating MJ, Wierda WG a kol. Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high- risk chronic lymphocytic leukaemia: a single- arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2014; 15(10): 1090-1099.

13) Caligaris-Cappio F, Gobbi M, Bofill M, Janossy G. Infrequent normal B lymphocytes express features of B chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1982; 155: 623-628.

14) Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999; 17: 399-408.

15) Carol Moreno, Emili Montserrat. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Reviews* 2008; 22: 211-219.

16) Criel A, Verhoef G, Vlietinck R, a kol. Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haematol* 1997; 97: 383-391.

- 17)** Criel Arnold a kol. The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia and Lymphoma* 1999; 33(1-2): 33-45.
- 18)** Cuneo A, Bigoni R, Negrini M, Bullrich F, a kol. Cytogenetic and interphase cytogenetic characterization of atypical chronic lymphocytic leukemia carrying BCL1 translocation. *Cancer Res* 1997; 57: 1144-1150.
- 19)** Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia - an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 1967; 29: 566-584.
- 20)** Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A a kol. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343(26): 1910-1916.
- 21)** Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, a kol. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2616-2622.
- 22)** Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, a kol. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2516-2522.
- 23)** Doubek M. Význam minimální zbytkové nemoci u chronické lymfocytární leukémie. *Klin Onkol* 2015; 28(3): 3S16-3S21.
- 24)** Doubek M., a kol. Co víme o incidenci chronické lymfocytární leukemie (CLL), a kde a jak jsou nemocní s CLL léčeni? *Transfuze a Hematologie dnes* 2010; 16(1): 11-15.
- 25)** Farhi DC., Chai CC, Edelman AS, Parveen T, Vo T-LT. Pathology of bone marrow and blood cells. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 2004; 360 s.
- 26)** Fátorová I. Zhotovení, panoptické barvení a hodnocení nátěru periferní krve. SOPV Č. 100, Laboratoř IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. 2016
- 27)** Furman RR, Sharman JP, Coutre SE a kol. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014; 370(11): 997-1007.
- 28)** Gahrton G, Robčrt KH, Friberg K, a kol. Extra chromosome 12 in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1980; 1: 146-147.

- 29)** Gogia Ajay, Raina Vinod a kol. Prognostic and Predictive Significance of Smudge Cell Percentage on Routine Blood Smear in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2014; 14(6): 514-517.
- 30)** Gumprecht F. Leucocytenzerfall in blute bal leukemic und bel sohwaren anamlan. *Deutches Archlv Kinlache Medicin.* 1896; 5: 523-548.
- 31)** Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G a kol. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376(9747): 1164-1174.
- 32)** Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, a kol. 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; 11: 5446-5456.
- 33)** Hallek M, Wanders L, Ostwald M, a kol. Serum beta (2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996; 22: 439-447.
- 34)** Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, a kol. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-1854.
- 35)** Heinivaara O. Smudge cells in lymphocytic leukemia. *Ann Med Intern Fenn.* 1959; 48: 69-75.
- 36)** Heintel D, Kienle D, Shehata M, a kol. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1216-1223.
- 37)** Horwitz M, Goode EL, Jarvik GP. Anticipation in familial leukemia. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 990-998.
- 38)** Cheson B, Bennett JM, Grever M, a kol. National Cancer Institutesponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 4990-4997.
- 39)** Cheson,B. D. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognosic factors. In Cheson B.D.(ed): *Chronic lymphocytic leukemia. Scientific Advances and Clinical Developments*, New York: Marcel Dekker 1993; 253-280.

- 40)** Johansson P, Eisele L, Klein-Hitpass L, a kol. Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2010; 34: 892-898.
- 41)** Kačirková P, Campr V. Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně. Grada; Praha 2007; 268 s.
- 42)** Kienle DL, Korz C, Hosch B a kol. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol* 2005; 23(16): 3780-3792.
- 43)** Klenner Pavel a kol. Hematologie: Vnitřní lékařství. Svazek VIII. Galén, 2003, 115 s. ISBN 80-7262-210-2.
- 44)** Kozák T. Chronická lymfocytární leukémie. *Onkologie* 2008; 2(3): 156-162.
- 45)** Kozák T., a kol. Indikace k léčbě chronické lymfocytární leukémie. *Transfuze a Hematologie dnes*, 2010b; 16(1): 68-69.
- 46)** Kozák T., a kol. Prognostické faktory chronické lymfocytární leukémie. *Transfuze a Hematologie dnes*, 2010a; 16(1): 56-61.
- 47)** Lens D, Dyer MJ, Garcia-Marco JM, a kol. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol* 1997; 99: 848-857.
- 48)** Macdonald D, Richardson H, Raby A. Practice guidelines on the reporting of smudge cells in the white blood cell differential count. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127: 105.
- 49)** Marionneaux S. a kol. Morphologic identification of atypical chronic lymphocytic leukemia by digital microscopy. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2014; 36: 459-464.
- 50)** Marthy K. A., Koepke J. A. The clinical usefulness of segmented vs stab neutrophil criteria for differential leucocyte counts. *Am J Clin Pathol* 1974; 61: 947-958.
- 51)** Matýšková M., Bulíková A., Kačirková P., Bourková L. Postup při hodnocení nátěru periferní krve. Česká hematologická společnost ČLS JEP [online]. [cit. 2016-1-17] Dostupné z:
http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/files/k_cinnostem/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Hodnoceni_nateru_pk_2013.pdf

- 52)** Mayer Jiří, Starý Jan a kol. Leukemie. Grada Publishing, 2002, 392 s. ISBN 80-7169-991-8.
- 53)** Mikulenková D., Matýšková M., Bourková L. Příprava a barvení nátěru periferní krve a aspirátu kostní dřeně. Česká hematologická společnost ČLS JEP [online]. [cit. 2016-12-1] Dostupné z: http://www.sekk.cz/infoservis/CHS_doporuceni-barveni.pdf
- 54)** Minot G, Isaacs R. Lymphatic leukemia: age, incidence, duration and benefit derived from irradiation. *Boston Med Surg J* 1924; 191: 1-9.
- 55)** Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1477-1480.
- 56)** Moreau, E.J., Matutes, E., A'Hern, R.P., Morilla, A.M., Morilla, R.M., Owusu-Ankomah, K.A., Seon, B.K. & Catovsky, D. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American Journal of Clinical Pathology* 1997; 108: 378-382.
- 57)** Morton LM, Wang SS, Devesa SS, a kol. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in United States, 1992-2001. *Blood* 2006; 107: 265-276.
- 58)** Navrkalová V., Kantorová B., Jarošová M., Pospíšilová Š. Molekulární prognostické markery chronické lymfocytární leukemie a jejich klinický význam. *Klin. Onkol* 2015; 28(3): 3S6-3S15.
- 59)** Nowakowski G, Lee Y, Bone N. Proteomic analysis of chronic lymphocytic leukemia cells identifies vimentin as a novel prognostic factor for aggressive disease. *Blood* 2005; 106: 209-213.
- 60)** Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, a kol. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: A universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 449-453.
- 61)** Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Bone ND, a kol. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009; 27(11): 1844-1849.
- 62)** Pecka, M., Bláha, M., Fátorová, I. a kol. Praktická hematologie. Laboratorní metody. Český Těšín: Infiniti art, 2010, 102-110 s. ISBN 978-809-0387-195.

- 63)** Pecka, M., Laboratorní hematologie v přehledu. Buňka a krvetvorba. Český Těšín: Finidr, 2002, 80-138 s. ISBN 80-86682-01-3.
- 64)** Penka, M., Tesařová E., a kol. Hematologie a transfuzní lékařství I. Hematologie. Praha: Grada, 2011, 21-344 s. ISBN 978-802-4734-590.
- 65)** Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, a kol. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014.
- 66)** Bartoš Vladimír, Jabor Antonín, Zámečník Miroslav. Preanalytická fáze 2005. Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP, 2005, 144 s. ISBN 802395198X, 9788023951981.
- 67)** Rai K, Sawitsky A, Cronkite EP, a kol. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-234.
- 68)** Rassenti LZ, Kipps TJ. Expression of Ig-beta (CD79b) by chronic lymphocytic leukemia B cells that lack immunoglobulin heavy-chain allelic exclusion. *Blood* 2000; 95: 2725-2727.
- 69)** Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, a kol. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Cancer Care* 2004; 13: 279-287.
- 70)** Schwarz J, Mikulenková D, Cermakova M, Polanska V, a kol. Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic lymphocytic leukemia: correlations with IgVH gene mutational status and other prognostic markers. *Neoplasma* 2006; 53: 219-225.
- 71)** Smolej L. Léčebné možnosti pro nemocné s chronickou lymfocytární leukémií a významnými přidruženými chorobami. *Klin Onkol* 2015; 28(3): 3S30-3S38.
- 72)** Smolej L, Doubek, M., Špaček M, et al. Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie (CLL). *Transf Hematol dnes* 2013; 19: 61–68.
- 73)** Stano-Kozubik K, Malcikova J, Tichy B, a kol. Inactivation of p53 and amplification of MYCN gene in a terminal lymphoblastic relapse in chronic lymphocytic leukemia patient. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2009; 189: 53-58.
- 74)** Stilgenbauer, S., Lichter, P., Döhner, H. Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 2000; 4: 48-72.

- 75)** Válková V., Cetkovský P. Současná role transplantace hematopoetických kmenových buněk v léčbě chronické lymfocytární leukémie. *Transfuze a Hematologie dnes*, 2010; 16(1): 81-87.
- 76)** Van Bockstaele F., Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Review* 2009; 23: 25-47.
- 77)** Zent CS, Kyasa MJ, Evans R, Schichman SA. Chronic lymphocytic leukemia incidence is substantially higher than estimated from tumor registry data. *Cancer* 2001; 92: 1325-1330.