

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



Studium nových prognostických faktorů u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Filip Vrbacký

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Lékařská biologie

Hradec Králové

2016

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská biologie na Ústavu Lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Filip Vrbacký, IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc., Lékařská fakulta UK v Hradci Králové.

Školitel konzultant: doc. MUDr. Pavel Žák Ph.D., IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno
doc. MUDr. Vít Procházka, Ph.D., Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská biologie dne 31.8.2016 v posluchárně KA105, areál Kampusu (ul. Zborovská) Lékařské fakulty UK v Hradci Králové od 11:00 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA NT 13412-4/2012 Ministerstva zdravotnictví České republiky, projektu koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky a programu PRVOUK P37 Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.

Titul, jméno, příjmení

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská biologie
Garant studijního programu

Obsah

SOUHRN	2
SUMMARY	3
ÚVOD DO PROBLEMATIKY	4
Chronická lymfocytární leukémie	4
CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	10
MATERIÁL A METODIKA	11
Soubor nemocných	11
Příprava kalibračních standardů pro PCR	13
Separace buněk, izolace RNA a reverzní transkripce v pilotní studii	13
Kvantifikační PCR pomocí univerzální knihovny sond	13
Separace buněk z plné krve izolace RNA a reverzní transkripce v hlavní studii	14
Kvantitativní PCR pomocí TaqMan® Gene Expression Assays	14
Stanovení exprese molekul CD38 a ZAP-70	15
Vyšetření mutačního stavu IGHV	15
Statistické vyhodnocení	15
VÝSLEDKY	16
Výběr vhodných kandidátních genů	16
Pilotní studie	16
Hlavní studie	18
DISKUZE	21
ZÁVĚRY	25
POUŽITÁ LITERATURA	26
PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	31

Souhrn

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejrozšířenější leukémií na západní polokouli s charakteristickou klonální proliferací a akumulací morfologicky zralých lymfocytů v kostní dřeni, periferní krvi a lymfatických tkáních. Klinický průběh CLL je velmi různorodý. Zatímco řada nemocných vůbec nevyžaduje léčbu a dožívají se s dobrou kvalitou života stejného věku jako lidé bez této choroby, existuje skupina nemocných, kteří rychle progredují a přes intenzivní léčbu umírají za několik let od stanovení diagnózy. Včasná zahájení vhodné léčby je pro ně tedy velmi důležité. Výzkum CLL v posledních letech je tak ve velké míře zaměřen na hledání tzv. prognostických ukazatelů, které by umožnily co nejdříve identifikovat nemocné s agresivní formou CLL, kteří mohou z této léčby významně profitovat.

U hematologických malignit, kde se buňky nacházejí přednostně v periferní krvi, kostní dřeni či lymfatických orgánech, se na rozdíl od solidních nádorů předpokládalo, že změny angiogeneze nebudou tak důležité. V posledních letech byla však zvýšená koncentrace angiogenních molekul prokázána i u řady hematologických malignit včetně CLL. Údajů týkajících se jejich možného prognostického, resp. prediktivního využití je však stále velmi málo.

V naší hlavní studii, která navazovala na předchozí pilotní výsledky, byla změřena míra exprese mRNA pro angiopoetin-2 (Ang-2), endoglin (CD105) a fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2) v maligních lymfocytech 97 neléčených nemocných s CLL (medián věku: 63 let, muži: 67 %, stádium dle Raie 0/I+II/III+IV: 29/55/16 %, nemutované variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinu (IGHV): 59 %). Následně bylo zhodnoceno, zda se exprese liší mezi skupinami rozdělenými dle prognózy onemocnění stanovené pomocí používaných prognostických ukazatelů nebo dle klinického průběhu onemocnění. Exprese Ang-2 byla statisticky významně vyšší v maligních lymfocytech nemocných s nemutovaným IGHV ($n = 80$, $p = 0,0023$) a kratší dobou do léčby 1. linie ($n = 97$, $p = 0,0437$). Exprese CD105 byla vyšší u nemocných s nemutovaným IGHV ($n = 80$, $p < 0,0001$), vysokou expresí 70kDa ζ -asociovaného proteinu (ZAP-70) ($n = 70$, $p = 0,0076$), středním a vysokým rizikem dle Raie ($n = 97$, $p < 0,0001$), progresí onemocnění v době odběru ($n = 97$, $p = 0,0003$), kratší dobou do léčby 1. linie ($n = 97$, $p < 0,0001$) a kratším celkovým přežitím ($n = 97$, $p = 0,0260$). Exprese FGF-2 nebyla statisticky významně odlišná u žádného z rozdělení do skupin podle sledovaných prognostických znaků.

Výsledky této studie ukazují vztah, mezi zvýšenou expresí Ang-2 a především CD105 v maligních lymfocytech a nepříznivou prognózou a klinickým průběhem CLL. Exprese těchto cytokinů tedy hraje roli v biologii a progresi CLL a angiogenní molekuly (obzvláště endoglin) jsou tak slibnými molekulárními prognostickými znaky.

Summary

Title: Study of new prognostic markers in patients with chronic lymphocytic leukemia

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemic disorder of adults in Western hemisphere. It is characterized by clonal proliferation and accumulation of morphologically mature lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and lymphatic tissues. Clinical course of CLL is extremely heterogeneous with some patients living for decades without need of therapy while others succumbing to the disease within several years. Thus, there has been great interest in identifying prognostic markers that could be used to distinguish patients with an aggressive form of CLL, because they might benefit from early intervention.

The process of angiogenesis has been shown to be crucial for growth and metastasizing ability of solid tumors. Angiogenesis in “liquid” tumors was supposed to be less important, nevertheless numerous recent studies have shown enhanced angiogenesis in many hematological malignancies including CLL. Elevated levels of circulating angiogenic cytokines and increased expression of genes encoding angiogenic factors have been reported in recent years in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) but data regarding their prognostic and predictive significance are still limited.

Therefore, in the present main study based upon our prior pilot results, we measured mRNA expressions of angiopoietin-2 (Ang-2), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and endoglin (CD105) by reverse transcription quantitative PCR in purified CD19⁺ cells from 97 untreated CLL patients (median age, 63 years; males, 67%; Rai 0/I+II/III+IV stages, 29/55/16%; unmutated variable region of immunoglobulin heavy chain (IGHV) genes, 59 %) and evaluated their possible association with established prognostic factors and clinical course of the disease. Higher expression of Ang-2 was significantly associated with unmutated IGHV genes (n = 80, p = 0.0023) and time to first treatment (n = 97, p = 0.0437). Higher CD105 expression was significantly associated with unmutated IGHV (n = 80, p < 0.001), high ZAP-70 expression (n = 70, p = 0.0076), Rai stage I-IV (n = 97, p < 0.001), progressive clinical course of CLL (n = 97, p = 0.0003), shorter time to first treatment (n = 97, p < 0.001) and shorter overall survival (n = 97, p = 0.0260). Expression of FGF-2 was not significantly associated with any of the prognostic markers.

These results indicate that elevated expression of Ang-2 and in particular CD105 by CLL cells is associated with unfavorable prognostic features and clinical outcome. Expression of both cytokines by malignant lymphocytes appears to play an important role in biology and progression of CLL; thus angiogenic molecules seem to be promising prognostic markers in CLL.

Úvod do problematiky

Chronická lymfocytární leukémie

Chronická lymfocytární leukémie (CLL), její průběh a klinické projevy byly poprvé podrobně zmíněny v roce 1924 Georgem Minotem a Raphaelem Isaacsem (Minot and Isaacs 1924). V roce 1966 pak byly popsány dva typy tohoto onemocnění s rozdílným dopadem na prognózu nemocných – pomalu a rychle progredující varianty (Galton 1966). O rok později bylo publikováno, že buňky CLL jsou zralé, funkčně nekompetentní lymfocyty (Dameshek 1967). Že se jedná o B-lymfocyty, bylo prokázáno s objevem povrchových imunoglobulinů až v roce 1972 (Aisenberg and Bloch 1972).

Zatímco dříve byla CLL považována za onemocnění pocházející ze zralých, imunologicky nekompetentních lymfocytů, které se kumulují pouze z důvodu poškození signálních drah, které vedou buňku k apoptóze (jako je např. zvýšená exprese antiapoptotického genu Bcl-2), v posledních letech se pohled na toto onemocnění výrazně změnil a na CLL je pohlíženo spíše jako na heterogenní chorobu pocházející z B-lymfocytů, které se mohou lišit stupněm aktivace, zralosti nebo buněčným podtypem. CLL je tak brána spíše jako onemocnění, pro které je typická dynamická rovnováha mezi aktivně se dělicími buňkami v zárodečných centrech lymfatických orgánů a klidovými buňkami, které jsou odolné vůči apoptóze a cirkulují v periferní krvi (Messmer et al. 2005). Aktivní proliferace navíc může vést ke vzniku a hromadění genových mutací a chromozomálních aberací, z nichž některé dále ovlivňují biologii i klinický vývoj CLL.

Zatímco morfologicky je toto onemocnění poměrně homogenní, prognóza a vývoj jednotlivých případů se může výrazně lišit. Zatím co část pacientů přežívá desítky let a jejich přežití se neliší od zdravé populace, část nemocných umírá na CLL již v průběhu několika let. Z tohoto důvodu je velmi důležité nalézt vhodné prognostické ukazatele, které umožní stanovit prognózu každého nemocného co nejdříve po určení diagnózy, aby bylo možné zvolit adekvátní individuální přístup a bylo možné zahájit léčbu u nemocných s nepříznivou prognózou co nejdříve.

Stanovení prognózy

Pohlaví ovlivňuje prognózu pacientů s CLL. Toto onemocnění je nejen častější u mužů než u žen, muži mají i horší prognózu (Catovsky et al. 1989). Podstata tohoto rozdílu však není dosud známa. Při rozhodování o zahájení léčby se k pohlaví nepřihlíží.

Již více než třicet let se pro stanovení rizika a zahájení léčby u pacientů s CLL používají klinické **stážovací systémy dle Raie a Bineta** (Binet et al. 1981; Rai et al. 1975). Oba jsou založeny na stanovení prognózy na základě fyzikálního a laboratorního vyšetření a spíše než budoucí vývoj onemocnění popisují jeho současný stav. Nejsou tudíž schopné rozeznat pacienty, kteří budou brzy rychle progredovat již v časném stádiu choroby. Oba tyto systémy jsou velmi jednoduché a stratifikují nemocné do 3 skupin podle rizika.

Kromě zdvojení času lymfocytů byl prokázán prognostický vliv u CLL i u řady molekul, které je možné detekovat v séru nemocných. Jedná se např. o sérovou aktivitu **laktát dehydrogenázy**, která je považována za ukazatel buněčného obratu a její zvýšení ukazuje na vyšší aktivitu řady hematologických malignit. **Thymidinkináza** je enzym, který hraje důležitou roli při syntéze DNA. Její koncentrace v séru se zvyšuje při pokročilejších stádiích CLL a progresi onemocnění. Zvýšený sérový **β_2 -mikroglobulin**, který tvoří součást hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) I. třídy, ukazuje na pokročilý stav CLL s výraznou lymfadenopatií a pokročilé onemocnění. Kratší doba přežití byla prokázána i u nemocných ve stádiu A dle Bineta s vysokou koncentrací **solubilního CD23** (sCD23) v séru (Sarfati et al. 1996).

U více než 80 % nemocných s CLL je přítomna alespoň jedna či více cytogenetických poruch, které lze detekovat pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) (Stilgenbauer et al. 2000). Na rozdíl od jiných malignit jsou u CLL velmi vzácné vyvážené translokace a mnohem častěji se objevují změny nevyvážené. **Delece 13q14** se vyskytuje u 40 – 60 % případů CLL a většinou se vyskytuje jako samostatná aberace. Nemocní, u kterých se delece 13q objevuje samostatně, mají lepší prognózu než pacienti bez ní či s větším počtem chromozomálních přestaveb. Novější studie ovšem ukazují, že i v této skupině se vyskytují jedinci se špatnou prognózou (Van Dyke et al. 2010). **Trizomie 12. chromozómu** se vyskytuje v 10 – 20 % případů CLL a je spojována s kratší dobou do progresu. Výsledky analýz z posledních let však ukazují, že tito nemocní mají delší celkové přežití (Hallek et al. 2010). U přibližně 10 % nemocných s CLL lze nalézt **deleci části dlouhého raménka 11. chromozómu**. Tato přestavba je statisticky významně spojena s výraznou lymfadenopatií, rychlejší progresí a kratším celkovým přežitím (Dohner et al. 1997). Novější práce však ukazují, že průběh onemocnění u těchto nemocných může být poměrně variabilní a liší se podle počtu buněk maligního klonu s touto aberací (Marasca et al. 2013). U přibližně 5 % neléčených nemocných s CLL byla prokázána **delece části krátkého raménka 17. chromozómu**. Prognóza u pacientů, u kterých je tato aberace nalezena ve více než 25 % buněk, je velmi špatná a průběh onemocnění je většinou agresivní, čas do progresu i celkové přežití jsou zkrácené a onemocnění hůře reaguje na léčbu (Tam et al. 2009). Delece vždy zahrnuje

lokus TP53 kódující protein p53, který je velmi důležitý pro správnou regulaci buněčného cyklu, odpověď buňky na poškození DNA a případné zahájení procesů vedoucích k apoptóze. Samotná delece je navíc velmi často doprovázena mutacemi v této oblasti na druhém chromozómu 17, což vede k poškození obou alel a prohloubení negativního efektu (Dicker et al. 2009; Rossi et al. 2009). I nemocní s jedním poškozením však mají horší prognózu než nemocní bez poškození genu TP53 (Zenz et al. 2010). Prognóza nemocných s **komplexním karyotypem** (alespoň 3 chromozomální aberace) je velmi nepříznivá se špatnou odpovědí na léčbu a krátkou dobou přežití.

Nemocné s CLL je možné rozdělit na dvě skupiny podle míry **somatických hypermutací těžkých řetězců imunoglobulinového genu (IGHV)**. U části nemocných vykazuje sekvence těžkého řetězce imunoglobulinu minimálně 98% homologii se zárodečnou DNA (tzv. nemutované IGHV). Tyto buňky patrně pocházejí z naivních B-lymfocytů a prognóza takových nemocných se významně liší od nemocných, kteří mají homologii nižší než 98 % (tzv. mutované IGHV) a jejichž maligní lymfocyty pocházejí patrně z paměťových B-lymfocytů (Schroeder and Dighiero 1994). Bylo prokázáno, že lymfocyty s nemutovaným IGHV mají častěji atypickou morfologii, onemocnění má agresivnější průběh a nemocní mají významně kratší dobu přežití ve srovnání s nemocnými s mutovaným IGHV (Damle et al. 1999; Hamblin et al. 1999). Rozdělení podle míry mutací v genu pro IGHV má však své výjimky. Např. prognóza pacientů s přestavbou VH3-21 je podobná jako u skupiny s nemutovaným IGHV bez ohledu na míru mutací, takže nemocní s mutovaným IGHV mají špatnou prognózu (Tobin et al. 2002).

Možnost prognostického využití míry exprese **CD38** u nemocných s CLL byla objevena při studiu imunofenotypových rozdílů maligních lymfocytů rozdělených podle v té době již známého mutačního stavu IGHV (Damle, et al. 1999). U nemocných s vysokým počtem CD38 pozitivních maligních lymfocytů byla prokázána kratší doba celkového přežití, pokročilejší stádium onemocnění a snížená odpověď na léčbu (Damle, et al. 1999; Durig et al. 2002). Velmi diskutovanou problematikou týkající se využití CD38 je množství buněk, u kterých musí být exprese této molekuly pozitivní. Řada prací používá 30 % (Damle, et al. 1999; Hamblin et al. 2002), jiné ale zmiňují 20 % (Durig, et al. 2002; Ibrahim et al. 2001), některé dokonce 7 % (Krober et al. 2002; Thornton et al. 2004).

Ačkoli se původně předpokládalo, že 70kDa ζ -asociovaný protein (**ZAP-70**) je exprimovaný pouze v T-lymfocytech a NK-buňkách (Chan et al. 1992), byla jeho exprese následně prokázána jak v maligních buňkách CLL, tak normálních B-lymfocytech (Rosenwald et al. 2001; Scielzo et al. 2006). V B-lymfocytech se ZAP-70 účastní signalizace prostřednictvím BCR. Stejně jako v případě CD38 byla prognostická hodnota variabilní exprese ZAP-70

v maligních lymfocytech CLL objevena při analýze buněk nemocných rozdělených podle rozdílného mutačního stavu IGHV. ZAP-70 z ní vyšel jako jeden z nejlépe odpovídajících genů (Rosenwald, et al. 2001). Výsledky následujícího výzkumu ukázaly, že nemocní s vysokou expresí ZAP-70 mají skutečně agresivnější formu CLL a kratší přežití (Crespo et al. 2003; Chen et al. 2005; Chen et al. 2002). V současné době je pro stanovení ZAP-70 používána metoda průtokové cytometrie. Neexistuje však standardní metodika zpracování buněk. Stanovení exprese ZAP-70 tedy není (stejně jako CD38) doporučováno k rutinnímu vyšetřování.

Angiogeneze

Angiogeneze je proces, při kterém je působením různých cytokinů tvořena ze stávajících cév nová vaskulatura. Angiogeneze provází řadu fyziologických jevů a její správná funkce je nezbytná již od období rané embryogeneze. Účastní se však i řady dalších fyziologických procesů, jako např. hojení ran apod. Patologickou angiogenezi můžeme pozorovat např. u aterosklerózy, revmatoidní artritidy a pochopitelně onkologických onemocnění. Samotný proces je v organismu velmi přísně kontrolován dynamickou rovnováhou mezi cirkulujícími angiogenními a antiangiogenními (angiostatickými) faktory, kontaktem buněk s extracelulární matrix i přímým kontaktem mezi buňkami.

U solidních nádorů hraje angiogeneze zásadní roli, neboť maligní buňky jsou závislé na přísunu kyslíku a živin nezbytných pro jejich přežití (Folkman 1971). U hematologických malignit, kde se buňky nacházejí přednostně v periferní krvi, kostní dřeni či lymfatických orgánech, se však předpokládalo, že změny angiogeneze nebudou tak důležité, neboť rozšíření cévní pleteně není pro maligní buňky nezbytné. První práce zabývající se touto problematikou se tedy začaly objevovat až o mnoho let později (Perez-Atayde et al. 1997). Role angiogenních faktorů při rozvoji hematologických malignit je stále předmětem intenzivního výzkumu.

Aberantní exprese řady angiogenních faktorů byla prokázána i u CLL. Původní názory, že výskyt jejich zvýšené koncentrace je následkem vysokého množství maligních lymfocytů a zvýšená koncentrace nemá na rozvoj onemocnění vliv, je již překonaný. Nové poznatky naopak ukazují, že význam angiogeneze je klíčový a narušení angiogenních signalizačních drah může výrazně ovlivnit proliferaci buněk, jejich přežití i průběh onemocnění. Zvýšená propustnost stěn nově vytvářených cév výrazně usnadňuje průchod maligních lymfocytů a tyto buňky tak mohou snáze procházet do cévního řečiště a zpět do lymfatických orgánů (Till et al. 2005). Zvýšená angiogeneze byla navíc pozorována u pacientů s pokročilejším klinickým stádiem CLL a kratší dobou přežití (Molica et al. 2002; Peterson and Kini 2001).

Velmi důležitým angiogenním faktorem, jehož vliv na chronickou lymfocytární leukémii byl prokázán, je **fibroblastový růstový faktor 2** (FGF-2) (Friesel and Maciag 1995). Nemocní s CLL mají vyšší koncentraci této molekuly v séru, resp. krevní plazmě (Aguayo et al. 2000; Smolej et al. 2006) a její koncentrace klesá po léčbě fludarabinem (Smolej et al. 2007) či kladribinem (Gora-Tybor et al. 2002). U nemocných s CLL v pokročilém stádiu onemocnění byla nalezena vyšší koncentrace FGF-2 v maligních lymfocytech (Menzel et al. 1996). Prognostický význam koncentrace FGF-2 však stále nebyl zcela objasněn a zůstává spíše rozporuplný (Duensing and Atzpodien 1995; Molica et al. 2007; Smolej, et al. 2006). Velmi omezené jsou i informace o expresi mRNA pro FGF-2 v maligních lymfocytech. Celou situaci navíc komplikuje skutečnost, že exprese FGF-2 je postranskripčně regulována pomocí anti-sense molekuly transkribované z genu NUDT6 (Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 6 gene), který je kódovaný komplementárním vláknem DNA a je zodpovědný za snížení stability mRNA pro FGF-2 (MacFarlane and Murphy 2010).

V případě zahájení angiogenních procesů, např. hypoxií, dojde k zahájení syntézy angiogenního faktoru **angiopoetin-2** (Ang-2) a uvolnění jeho zásob z endoteliálních buněk (Burger 2010). Angiopoetin-2 následně kompetitivně vytěsňuje angiopoetin-1 z receptoru Tie-2 a buňky se tak stanou citlivější k dalším angiogenním faktorům (Maffei et al. 2010a). Pro funkci Ang-2 je velmi důležitá spolupráce s vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF), jehož koncentrace moduluje další efekt působení Ang-2. Je-li koncentrace VEGF vysoká, dojde po destabilizaci cévních stěn prostřednictvím Ang-2 k dalšímu rozvoji angiogenetických procesů. V případě, že je koncentrace VEGF nízká, destabilizace cévních stěn vede spíše k regresii cév v dané oblasti a Ang-2 tak působí spíše antiangiogenně (Holash et al. 1999). Zvýšená exprese Ang-2 je navíc velmi důležitá pro metastatickou aktivitu některých solidních nádorů (Imanishi et al. 2011; Schulz et al. 2011). U nemocných s CLL byla prokázána zvýšená koncentrace Ang-2 v krevní plazmě. Množství Ang-2 bylo navíc vyšší u nemocných v pokročilých stádiích dle Bineta a nepříznivou prognózou dle cytogenetické analýzy, vysoké koncentrace β_2 -mikroglobulinu, nemutovaným IGHV a zvýšenou expresí ZAP-70 a CD38. Výsledky multivariantní analýzy navíc vedly k závěru, že množství Ang-2 v plazmě může být použito jako nezávislý prediktor času do zahájení léčby (Huttmann et al. 2006; Maffei et al. 2010b). Významně zvýšená exprese Ang-2 samotnými maligními lymfocyty byla potvrzena u nemocných s nemutovaným IGHV a kratší dobou do progresu. Jedná se však spíše o ojedinělé práce na menších souborech nemocných (Maffei et al. 2007; Martinelli et al. 2008; Vrbacky et al. 2010).

Endoglin (CD105) na povrchu řady buněk tvoří součást receptorů pro TGF β (Cheifetz et al. 1992). Endoglin není schopen TGF β vázat a nemá vlastní kinázovou doménu, pouze moduluje

aktivaci drah, které vedou ke změně genové exprese a k aktivaci angiogeneze. Zvýšená exprese endoglinu na povrchu maligních buněk byla prokázána u řady onkologických onemocnění včetně hematologických malignit. U některých z nich byl prokázán statisticky významný prognostický efekt koncentrace endoglinu. V případě rakoviny prsu, ovariálního karcinomu, rakoviny prostaty či onemocnění trávicího traktu včetně adenokarcinomu tlustého střeva bylo dokonce potvrzeno, že endoglin může být ještě účinnější, než některé do té doby používané ukazatele (El-Gohary et al. 2007; Gomez-Esquer et al. 2004; Minhajat et al. 2006; Nikiteas et al. 2007; Taskiran et al. 2006). Dat týkajících se úlohy endoglinu u chronické lymfocytární leukémie je však velmi málo. V plazmě nemocných s CLL byla prokázána zvýšená koncentrace solubilního endoglinu (sCD105) ve srovnání se zdravými kontrolami. Koncentrace sCD105 byla vyšší u nemocných s progresivním onemocněním a s pokročilými stádii onemocnění. U těchto nemocných byla prokázána statisticky významně kratší doba přežití bez progresu (Smolej et al. 2008). Rozsáhlejší práce zabývající se expresí CD105 samotnými maligními lymfocyty zcela chybí. Této problematice se věnovala pouze jediná práce, která ovšem zahrnovala velmi omezený počet nemocných a její výsledky je tedy nezbytné brát jako pilotní (Kay et al. 2002).

Cíle disertační práce

1. Zvolit vhodné kandidátní geny s možným prognostickým potenciálem u CLL.
2. Zavést vhodnou metodiku separace maligních lymfocytů z periferní krve nemocných s chronickou lymfocytární leukémií.
3. Zvolit vhodnou metodiku izolace RNA ze separovaných lymfocytů.
4. Stanovit míru exprese vybraných genů v maligních lymfocytech.
5. Zhodnotit vztah exprese vybraných genů s prognózou nemocných s CLL s využitím tradičních i moderních prognostických znaků používaných u tohoto onemocnění.
6. Zhodnotit souvislost exprese vybraných genů s klinickými parametry (období do progresu, celkové přežití).

Materiál a metodika

Soubor nemocných

V laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové bylo v letech 2008-2015 vyšetřeno 130 vzorků periferní krve neléčených nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. Diagnóza CLL byla u všech stanovena dle klasických kritérií International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) (Hallek et al. 2008). Vzorky byly získány od nemocných, kteří byli informováni ošetřujícím lékařem a podepsali informovaný souhlas s účastí v projektu. Studie probíhala v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové.

V pilotní studii bylo vyšetřeno 33 nemocných (25 mužů a 8 žen) s mediánem věku 63 let (36-79 let) (Tab. 1). V navazující hlavní studii byly analyzovány vzorky 97 nemocných (65 mužů a 32 žen) s mediánem věku 63 let (36-84 let) (Tab. 1). Podrobná charakteristika rozdělení nemocných podle prognostických ukazatelů je uvedena v tabulkách 2 (pilotní studie) a 3 (hlavní studie).

Tab. 1: Charakteristika souboru nemocných.

Charakteristika	Pilotní studie	Hlavní studie
Celkový počet nemocných	33	97
Muži	25 (76 %)	65 (67 %)
Poměr muži/ženy	3,13	2,03
Medián věku (rozsah), roky	63 (36-79)	63 (36-84)

Tab. 2: Charakteristika prognostických znaků v souboru nemocných analyzovaných v pilotní studii.

Mutační stav IGHV	Mutovaný	Nemutovaný	Celkem
	10 (37 %)	17 (63 %)	27
Exprese CD38	Nízká	Vysoká	Celkem
	22 (69 %)	10 (31 %)	32
Exprese ZAP-70	Nízká	Vysoká	Celkem
	17 (53 %)	15 (47 %)	32
Riziko onemocnění dle Raie	Nízké	Střední + Vysoké	Celkem
	12 (36 %)	19 (58 %) + 2 (6 %)	33
Průběh onemocnění v době odběru	Stabilní	Progrese	Celkem
	22 (67 %)	11 (33 %)	33

Tab. 3: Charakteristika prognostických znaků v souboru nemocných analyzovaných v hlavní studii.

Mutační stav IGHV	Mutovaný	Nemutovaný	Celkem
	33 (41 %)	47 (59 %)	80
Exprese CD38	Nízká	Vysoká	Celkem
	10 (14 %)	60 (86 %)	70
Exprese ZAP-70	Nízká	Vysoká	Celkem
	44 (63 %)	26 (37 %)	70
Chromozomové přestavby	Příznivá prognóza	Nepříznivá prognóza	Celkem
	46 (64 %)	26 (36 %)	72
Riziko onemocnění dle Raie	Nízké	Střední + Vysoké	Celkem
	28 (29 %)	53 (55 %) + 16 (16 %)	97
Průběh onemocnění v době odběru	Stabilní	Progrese	Celkem
	63 (65 %)	34 (35 %)	97

Příprava kalibračních standardů pro PCR

cDNA náhodně vybraného vzorku s dostatečnou expresí genů Ang-2 a Abl1 byla amplifikována pomocí primerů Abl1-F: ACAGGGGACACCTACACAGC, Abl1-R: TGCAGCAAGGTACTIONCACAGC a Ang-2-F: GGAACACTCCCTCTCGACAA, Ang-2-R: AAGTTGGAAGGACCACATGC s použitím polymerázového systému Takara Ex Taq® Hot Start Version (Takara, Japonsko) v blokovém cyklu PTC-200 (MJ Research, USA) podle následujícího programu: 94 °C, 2 min; 40 cyklů (94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30s); 72 °C, 10 min; 4 °C, nekonečno. Produkty PCR reakcí byl rozdělen pomocí elektroforézy ve 2% agarózovém gelu, DNA odpovídající délce předpokládaného produktu byla vyříznuta a izolována z gelu pomocí Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Německo). Dva mikrolitry produktu PCR reakce byly T-A klonováním pomocí soupravy QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit (Qiagen, Německo) vloženy do plazmidu pDrive a následně klonovány v kompetentních buňkách *E. coli* EZ Competent Cells (součást soupravy). Ze získaných bakterií byly po kultivaci pod selekčním tlakem antibiotika *Ampicilin* následně soupravou QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo) izolovány plazmidy obsahující sekvenci kalibračního standardu. Všechny soupravy byly používány dle doporučení výrobce.

Separace buněk, izolace RNA a reverzní transkripce v pilotní studii

Mononukleární buňky byly separovány z periferní krve antikoagulované K₃EDTA gradientovou centrifugací pomocí Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, USA). RNA z 2×10^6 separovaných buněk byla izolována pomocí silikátových kolon High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Německo). Pět mikrolitrů RNA bylo následně reverzně přepsáno v celkovém objemu 20 μ l na komplementární DNA (cDNA) pomocí soupravy Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo) s použitím oligo(dT)₁₈ primerů, které jsou součástí soupravy. cDNA byla uchována při teplotě -20 °C do doby analýzy pomocí PCR v reálném čase. Všechny soupravy byly používány dle doporučení výrobce.

Kvantifikační PCR pomocí univerzální knihovny sond

Absolutní kvantifikace pomocí PCR v reálném čase byla provedena pomocí LightCycler® TaqMan® Master (Roche, Německo) s využitím univerzální knihovny sond dle doporučení

výrobce. Primery a použité sondy byly: Abl1-F: GAGAAGGACTACCGCATGGA, Abl1-R: GGGATTCCACTGCCAACAT, Universal ProbeLibrary Probe #44 (Roche, Německo); Ang-2-F: CACGTTAACATTCCCTAATTCTACAG, Ang-2-R: CTCACGTCGCTGAATAATTGTC, Universal ProbeLibrary Probe #25 (Roche, Německo). Výsledná exprese byla odečtena v software LightCycler® Software 5.32 pomocí metody „Second Derivative Maximum Method“ z kalibračních křivek amplifikace vzorků plazmidů o známém počtu molekul DNA.

Separace buněk z plné krve izolace RNA a reverzní transkripce v hlavní studii

Separace CD19⁺ buněk byla provedena pomocí RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, USA) a gradientové centrifugace s Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, USA). 35×10^6 buněk bylo lyzováno v 1 ml TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) a uloženo do -80 °C do doby izolace RNA. Pět nanogramů RNA izolované dle doporučení výrobce TRIzol Reagent bylo přepsáno do cDNA pomocí SuperScript III First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen, USA). cDNA byla použita okamžitě k analýze pomocí kvantitativní PCR nebo uchována při -20 °C do dalšího zpracování. Všechny soupravy byly používány dle doporučení výrobce.

Kvantitativní PCR pomocí TaqMan® Gene Expression Assays

Relativní kvantifikace byla provedena v termocykleru Rotor Gene 6000 (Qiagen, Německo) pomocí TaqMan Gene Expression Master Mix kit (Life technologies, USA) a reakčních směsí: Ang-2 - TaqMan® Gene Expression Assays (angiopoietin 2): Hs01048042_m1; CD105 - TaqMan® Gene Expression Assays (endoglin): Hs00923996_m1; FGF-2 - TaqMan® Gene Expression Assays (FGF2): Hs00266645_m1; NUDT6 - TaqMan® Gene Expression Assays, (Nudix): Hs00246601_m1 (vše Life Technologies, USA) dle doporučení výrobce. Data byla vyhodnocena pomocí software Rotor Gene 6000 Series, verze 1.7 (build 87), dodávaným s termocyklerem Rotor Gene 6000 v módu „Quantitation“. Analýza relativní kvantifikace $\Delta\Delta Ct$ byla provedena pomocí programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., USA).

Stanovení exprese molekul CD38 a ZAP-70

Expres molekul CD38 i ZAP-70 byla provedena na průtokovém cytometru EPICS XL (Beckman Coulter, USA). V obou případech bylo 25 μ l periferní krve (1×10^6 buněk/ml) zafixováno, v případě ZAP-70 permeabilizováno činidlem IntraPrep Permeabilization reagent (Beckman Coulter, USA) a následně 15 minut inkubováno s protilátkami CD5-FITC, CD19-PC5 a CD38-PE (vše Beckman Coulter, USA) nebo ZAP-70-PE, klon 1E7.2 (Caltag Laboratories, USA). Jako izotopová kontrola byla použita protilátka IgG1-PE (Beckman Coulter, USA). Červené krvinky byly lyzovány lyzačním roztokem OptiLyse C (Beckman Coulter, USA). Analýza byla provedena v programu Flow Jo (Tree Star, Inc., USA). Hodnoceno bylo minimálně 25 000 CD5⁺/CD19⁺ buněk. Vzorek byl považován za CD38 pozitivní, pokud byl signál pozitivní na více než 30 % analyzovaných buněk a ZAP-70 pozitivní, pokud byl signál pozitivní na více než 20 % analyzovaných buněk.

Vyšetření mutačního stavu IGHV

Ze vzorku periferní krve byly pomocí Ficol PaqueTM (Sigma, USA) separovány mononukleární buňky, ze kterých byla izolována RNA pomocí TRIzol Reagent (Invitrogen, USA). Reverzní transkripce byla provedena reverzní transkriptázou Superscript II (Invitrogen, USA) s náhodnými hexanukleotidovými primery. Všechny postupy byly provedeny dle doporučení výrobců. Sangerovým sekvenováním s následnou analýzou v software Chromas verze 1.5 (Technelysium, Austrálie) byla analyzována sekvence maligního klonu. Analýza odlišnosti sekvence maligního klonu od zárodečné DNA byla provedena pomocí služby IgBLAST (dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Geny byly považovány za mutované, pokud byla jejich homologie se zárodečnou linií nižší než 98 % (Hamblin, et al. 1999).

Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení testu χ^2 , neparametrického Mann-Whitney U testu i křivek přežití bylo stejně jako grafické znázornění dat pomocí bodových a krabicových grafů provedeno ve statistickém prostředí R (R Core Team 2014). Křivky přežití byly konstruovány dle Kaplan-Meierovy metody. Ke stanovení rozdílu v přežití byl použit log-rank test. Obojí bylo opět provedeno ve statistickém prostředí R s využitím knihovny *survival* verze 2.38. Hladina statistické významnosti (p) byla u všech testů stanovena na 0,05.

Výsledky

Výběr vhodných kandidátních genů

Vzhledem k velmi zajímavě se rozvíjícímu poznání o významu angiogeneze u CLL jsme se rozhodli, že se budeme věnovat této oblasti. Prací týkajících se exprese angiogenních faktorů maligními lymfocyty CLL je totiž velmi málo a navíc se jedná o problematiku, které se pracoviště IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové dlouhodobě věnuje. Na základě literární rešerše byly vybrány angiopoetin-2, endoglin a fibroblastový růstový faktor 2.

Pilotní studie

Příprava cDNA a kvantifikačních reakcí

První část projektu byla zaměřena na zvolení optimální metodiky izolace RNA ze vzorků nemocných s chronickou lymfocytární leukémií, která by byla používána v naší studii. Mononukleární buňky byly separovány z periferní krve antikoagulované K₃EDTA od 33 nemocných s CLL. Pro svou jednoduchost byla jako metoda první volby zvolena izolace pomocí křemičitých kolon. RNA izolovaná z 200 µl buněčné suspenze byla okamžitě uložena do -80 °C, kde byla uchována do doby provedení reverzní transkripce.

Pro účely pilotní studie byl z angiogenních faktorů, jejichž exprese v maligních lymfocytech nemocných s CLL měla být stanovena, zvolen gen pro angiopoetin-2. Pro normalizaci byl zvolen u CLL často používaný udržovací gen Abl1. Pro navržení vhodných systémů pro kvantitativní analýzu pomocí PCR v reálném čase byla použita aplikace Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche, Německo) (Roche Life Science), která je založená na databázi 165 krátkých hydrolytických (tzv. TaqMan) sond obsahujících pro zvýšení specifity LNA modifikované nukleotidy. Specifita obou detekčních směsí byla ověřena pomocí gelové elektroforézy produktů kvantifikační PCR reakce. V obou případech reakce neobsahovaly žádný významný produkt, který by délkou neodpovídal navržené PCR reakci.

Příprava standardů pro pilotní studii

Pomocí aplikace Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche, Německo) (Roche Life Science) byly navrženy primery, jejichž cílové sekvence se nacházejí alespoň 100 bp vně oblasti rozpoznávané primery vybranými pro kvantifikační reakci. Pomocí těchto primerů byla

z cDNA náhodně vybraného pacienta provedena příprava kvantifikačních standardů dle postupu uvedeného v kapitole *Materiál a metodika*.

Kvantifikace transkripce pomocí PCR v reálném čase

Před samotnou kvantifikací pomocí PCR v reálném čase byl pro každý sledovaný gen rozmražen jeden z aliquotů standardu o koncentraci 1×10^9 molekul/ μ l. Po rozmražení byla z každého standardu připravena ředící řada kalibrátorů pro nadcházející absolutní kvantifikaci v rozsahu $1 \times 10^6 - 1 \times 10^2$ molekul/ μ l. Účinnost obou systémů byla vždy vyšší než 95 % při velmi dobré linearitě použitých měření kalibrátorů ($r > 0,99$).

Výsledky absolutní kvantifikace exprese genu pro Ang-2 byly normalizovány pro vyrovnání možných rozdílů v množství cDNA v jednotlivých vzorcích pomocí sjednocení na jednotkové množství exprese udržovacího genu Abl-1. Všechny výsledky byly analyzovány jako poměr exprese těchto dvou genů.

Statistická analýza výsledků pilotní studie

Nejdříve bylo zapotřebí stanovit hraniční hodnotu odlišující vzorky s nízkou a vysokou mírou exprese Ang-2. Tato hodnota byla empiricky stanovena na $7,5 \times 10^{-3}$. Vzorky s nižší expresí dosahovaly velmi nízké míry exprese Ang-2. Při použití této hraniční hodnoty byla exprese genu pro Ang-2 vysoká u 12 a nízká u 21 nemocných.

Vztah exprese Ang-2 a mutačního stavu IGHV byl analyzován u 28 nemocných, neboť ostatní nemocní neměli mutační stav stanovený. Jeden případ s mutovaným IGHV byl z analýzy vyloučen, neboť maligní klon využíval přestavbu VH3-21, která znamená nepříznivou prognózu i při mutovaném stavu IGHV. Je ale zajímavé, že míra exprese Ang-2 u tohoto nemocného byla velmi vysoká. Vztah mezi mutovaným IGHV a nízkou mírou exprese Ang-2 ($n = 27$; $p = 0,010$) byl statisticky významný. Statisticky významný byl i vztah vysoké exprese CD38 a Ang-2 ($n = 32$, $p = 0,011$). Vztah exprese Ang-2 s expresí ZAP-70 ($n = 32$, $p = 0,784$), klinickým stádiem dle Raie ($n = 33$, $p = 0,305$), stavem onemocnění v době odběru ($n = 33$, $p = 0,443$) a dobou do první linie léčby ($n = 33$, $p = 0,090$) statisticky významný nebyl.

Závěry pilotní studie

Ačkoli studie prokázala, že použitá metoda umožňuje kvalitní kvantifikaci genové exprese genu Ang-2, ukázala i zásadní slabinu použitého přístupu. Exprese Ang-2 v maligních lymfocytech je v řadě případů velmi nízká a metoda založená na křemičitých kolonách neumožňuje izolaci RNA o dostatečně vysoké koncentraci, aby bylo možné tyto nízké

koncentrace kvalitně odlišit. Je tedy nezbytné použít jinou metodu izolace RNA umožňující vyšší koncentraci celkové (a tedy i studované) RNA.

Hlavní studie

Příprava cDNA

Vzhledem k rozvoji metod separace buněk CLL jsme se rozhodli v navazující studii použít specifitější způsob založený na negativní selekci CD19 pozitivních lymfocytů pomocí RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, USA), který umožnil analýzu maligních lymfocytů s vysokou čistotou, která dosahovala více než 95 % všech elementů ve výsledné suspenzi. Pro izolaci RNA jsme zvolili metodu založenou na TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), který umožňuje vytvoření lyzátů z vyššího počtu buněk při možném rozpuštění výsledné RNA do menšího objemu. Příprava cDNA byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole *Materiál a metodika*.

Příprava kvantifikačních reakcí

V průběhu pilotní studie bylo pracoviště vybaveno novým, modernějším, cyklem pro PCR v reálném čase RotorGene 6000 (Qiagen, Německo), který umožňuje provádět více paralelních reakcí v jednom běhu (72 místo 32). Změny byly provedeny i v analytickém postupu. Místo Universal ProbeLibrary (Roche, Německo) byl pro všechny geny použit na našem pracovišti nově využívaný systém expresních esejí firmy Life Technologies (Life technologies, USA). Po ověření účinnosti kvantifikačních reakcí, která ve všech případech dosahovala hodnot vyšších než 95 %, byla za vhodnou metodu relativní kvantifikace zvolena metoda $\Delta\Delta C_t$. Tato metoda nevyžaduje provádění kalibrace v každém běhu a umožňuje tak analýzu vyššího počtu vzorků, popř. využití tripletů místo dubletů použitých v pilotní studii. Jako udržovací gen byl použit HPRT1, který naše laboratoř využívá.

Kvantifikace pomocí PCR v reálném čase

Kvantifikace pomocí PCR v reálném čase byla provedena reakční směsí TaqMan Gene Expression Master Mix a komerčně dostupnými systémy pro detekci množství cDNA firmy Life Technologies. Součástí každé skupiny reakcí byl i kalibrátor umožňující kompenzaci variability mezi jednotlivými běhy v metodě $\Delta\Delta C_t$. Jako kalibrátor byl pro každý gen vybrán náhodně vybraný vzorek s dostatečnou mírou exprese. Hodnota fluorescence pro odečtení bodů křížení

(Ct) jednotlivých vzorků byla vybrána ručně v obslužném software cykleru RotorGene 6000. Analýza $\Delta\Delta C_t$ byla provedena v software Microsoft Excel 2010.

Analýza výsledků hlavní studie

V hlavní studii byla analyzována exprese genů pro Ang-2, CD105 a FGF-2 maligními lymfocyty izolovanými z periferní krve 97 nemocných s CLL. Vzhledem ke známé regulaci genové exprese FGF-2 pomocí anti-sense genu NUDT6, jsme zařadili do studie i analýzu exprese této regulační molekuly, abychom ověřili možnost regulace množství transkriptu FGF-2 pomocí NUDT6 (MacFarlane and Murphy 2010).

Analýza exprese genu pro angiotensin-2

Vztah exprese angiotensinu-2 a mutačního stavu IGHV byl analyzován u 80 nemocných. Nemocní s nemutovaným IGHV, tedy nepříznivou prognózou, měli statisticky významně vyšší expresi Ang-2 ($n = 80$, $p = 0,0023$). V souboru nemocných analyzovaných v této studii nebyl statisticky významný rozdíl v expresi Ang-2 mezi nemocnými s nízkou, resp. vysokou expresí CD38 ($n = 70$, $p = 0,6687$) a ZAP-70 ($n = 70$, $p = 0,0720$). Exprese genu pro Ang-2 nebyla statisticky významně odlišná ani u nemocných rozdělených na základě rizika onemocnění podle stádia dle Raie (nízké proti střední a vysoké) ($n = 97$, $p = 0,3599$), u nemocných rozdělených na základě klinického průběhu onemocnění (stabilní proti progredující) ($n = 97$, $p = 0,3038$) a u nemocných s rozdílnou prognózou stanovenou na základě cytogenetické analýzy často se vyskytujících chromozomových změn ($n = 72$, $p = 0,2405$).

Období do léčby 1. linie bylo u nemocných s vysokou expresí Ang-2 statisticky významně kratší ($n = 97$, $p = 0,0437$) s mediánem u nemocných s vysokou expresí Ang-2 6 měsíců; u nemocných s nízkou expresí Ang-2 nebylo mediánu dosaženo. Výsledek je však ovlivněn velkým počtem nemocných, kteří byli do studie zařazeni v čase počínající progresi. Doba celkového přežití se u nemocných s vysokou a nízkou expresí Ang-2 statisticky významně nelišila ($n = 97$, $p = 0,1551$).

Analýza genu pro endoglin

Expresí mRNA endoglinu se statisticky významně lišila u nemocných rozdělených podle mutačního stavu IGHV ($n = 80$, $p < 0,0001$). Expresí byla vyšší u nemocných s nemutovaným IGHV, tedy horší prognózou. Expresí CD105 byla statisticky významně vyšší i u nemocných s vyšší expresí proteinu ZAP-70 ($n = 70$, $p = 0,0076$), nemocných s nepříznivým karyotypem ($n = 72$, $p = 0,0223$), nemocných se středním a vysokým rizikem onemocnění podle stádia

dle Raie (nízké proti střední a vysoké) ($n = 97$, $p < 0,0001$) a nemocných, u kterých byl odběr proveden v progresi onemocnění ($n = 97$, $p = 0,0003$). U nemocných rozdělených do skupin podle exprese molekuly CD38 nebyl v expresi CD105 statisticky významný rozdíl ($n = 70$, $p = 0,0752$).

Období do léčby 1. linie bylo u nemocných s vysokou expresí endoglinu statisticky významně kratší ($n = 97$, $p < 0,0001$). Medián času do progresu u nemocných s vysokou expresí endoglinu byl 0 měsíců; u nemocných s nízkou expresí nebylo mediánu dosaženo. Výsledek je však opět ovlivněn velkým počtem nemocných, kteří byli do studie přijati v čase počínající progresu. U nemocných s vysokou expresí endoglinu byla statisticky významně kratší i doba celkového přežití ($n = 97$, $p = 0,0260$). U obou skupin nebylo dosaženo mediánu přežití.

Analýza genu pro fibroblastový růstový faktor 2

Expresí genu pro FGF-2 se u nemocných rozdělených podle mutačního stavu IGHV statisticky významně nelišila ($n = 80$, $p = 0,4061$). Statisticky významný rozdíl nebyl ani u nemocných rozdělených podle exprese CD38 ($n = 70$, $p = 0,3516$) a ZAP-70 ($n = 70$, $p = 0,4808$), prognózy stanovené na základě cytogenetického vyšetření ($n = 72$, $p = 0,4855$) a klinického průběhu onemocnění v době odběru ($n = 97$, $p = 0,1712$). Statisticky významný rozdíl byl pouze u nemocných rozdělených do skupin na základě rizika onemocnění podle stádia dle Raie ($n = 97$, $p = 0,0432$).

Medián období do léčby 1. linie se u nemocných rozdělených do skupin podle exprese FGF-2 významně nelišil ($n = 97$, $p = 0,1813$). Výsledek je však opět ovlivněn velkým počtem nemocných, kteří byli do studie přijati v čase počínající progresu onemocnění. Celkové přežití mezi skupinami rozdělenými podle exprese FGF-2 se také statisticky významně nelišilo ($n = 97$, $p = 0,1027$).

Analýza exprese regulačního genu NUDT6

Expresí genu FGF-2 je post-transkripčně regulovaná pomocí transkriptu genu NUDT6, který se nachází na komplementárním vlákně DNA a s genem pro FGF-2 se částečně překrývá (MacFarlane and Murphy 2010). Pro ověření možnosti regulace exprese FGF-2 v maligních lymfocytech nemocných s CLL prostřednictvím variabilní exprese genu NUDT6 bylo provedeno měření exprese i tohoto genu. Gen NUDT6 je však v těchto buňkách exprimován velmi stabilně a rozdíl exprese u nejméně a nejvíce exprimujícího vzorku byl pouze 1,4 řádu (po vyloučení jediné odlehlé hodnoty pouze 1,1 řádu). Interkvartilově byla exprese rozdílná pouze trojnásobně.

Diskuze

CLL je onemocnění s velmi variabilním průběhem. Zatímco délka života části nemocných se neliší od jedinců zdravé populace, část nemocných na toto onemocnění umírá již během několika let od stanovení diagnózy. Je proto velmi důležité co nejdříve stanovit prognózu onemocnění a přizpůsobit podle ní přístup k jednotlivým nemocným. Klasické prognostické ukazatele, mezi které patří např. stanovení klinického stádia či aktuální průběh onemocnění, rozlišují nemocné spíše podle stávajícího rozsahu CLL a jejich význam je tak velmi omezený. Vzhledem k narůstajícímu počtu publikací prokazujících roli angiogeneze u hematologických malignit jsme se zaměřili na tuto oblast, která nebyla u CLL prozkoumána v takovém rozsahu, jako u jiných maligních onemocnění (Folkman 1971; Perez-Atayde, et al. 1997). Na základě literárních údajů a vlastních výsledků s variabilní expresí v séru/plazmě nemocných s CLL jsme zvolili geny pro angiopoetin-2, endoglin a fibroblastový růstový faktor 2.

V pilotní studii jsme analyzovali soubor 33 nemocných s mediánem věku 63 let, což je výrazně méně, než udává literatura (přibližně 70 let v době diagnózy). Nižší věk je způsoben tím, že IV. interní hematologická klinika je hematologickým centrem pro Královéhradecký a Pardubický kraj České republiky a naše pracoviště poskytuje konziliární vyšetření a převzetí léčby pro nemocné s nepříznivým průběhem onemocnění. Z regionálních pracovišť jsou proto odesíláni především mladší nemocní, u nichž je více možností léčebného ovlivnění CLL. Starší nemocní jsou více léčeni paliativně na spádových pracovištích. V tomto souboru nemocných byla RNA izolována pomocí velmi snadné a rozšířené metody založené na nepřímé vazbě (prostřednictvím kladně nabitých iontů) nukleových kyselin na záporně nabitě křemičité povrchy. Analýza exprese genu pro angiopoetin-2, který byl zvolen jako první gen analyzovaný v této pilotní studii, ukázala, že řada vzorků byla na hranici detekovatelnosti transkriptů pomocí PCR v reálném čase a bude tedy zapotřebí zvolit metodu izolující RNA ve vyšší koncentraci.

V následujících experimentech jsme proto použili izolaci založenou na TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), která umožňuje izolovat RNA z většího množství buněk do velmi malého objemu vody nebo pufru. Zároveň byla použita vhodnější metoda separace CD19 pozitivních buněk. V této navazující studii bylo vyšetřeno 97 nemocných s mediánem věku také 63 let (36-84). Nižší věk skupiny lze vysvětlit stejnými důvody jako v případě pilotní studie.

Angiopoetin-2 hraje v angiogenezi zásadní roli. V případě zahájení angiogenních procesů dojde k jeho navázání na receptor Tie-2, čímž se buňky endotelu stanou citlivější k dalším angiogenním faktorům (Maffei, et al. 2010a). Ve spolupráci s VEGF způsobuje Ang-2

destabilizaci stěn stávajících cév a umožňuje jejich další přestavbu (Folkman 2002). Zvýšená exprese Ang-2 byla prokázána u pevných nádorů i hematologických malignit (Imanishi, et al. 2011; Schulz, et al. 2011). Zvýšená koncentrace Ang-2 v plasmě byla potvrzena i u nemocných s CLL, kteří měli nemutovaný IGHV, vysokou expresi ZAP-70 či CD38 a u nemocných se středním či vysokým cytogenetickým rizikem a pokročilými stádii dle Bineta (Huttmann, et al. 2006; Maffei, et al. 2010b). Zdroj Ang-2 je však stále nedostatečně objasněný. Vysoká exprese Ang-2 maligními lymfocyty CLL byla potvrzena pouze v ojedinělých studiích u nemocných s nemutovaným IGHV a kratší dobou do progresu (Maffei, et al. 2007; Martinelli, et al. 2008), což jsme potvrdili i v naší pilotní studii (n = 27; p = 0,010), jejímž výsledkem byla i statisticky významná závislost mezi vysokou expresí mRNA pro Ang-2 a vysokou expresí CD38 (n = 32, p = 0,011) (Vrbacky, et al. 2010). Vyšší exprese mRNA Ang-2 u nemocných s nemutovaným IGHV byla potvrzena i v naší navazující hlavní studii analyzující expresi v separovaných CD19⁺ buňkách (n = 80, p = 0,0023). Rozdílná exprese u nemocných rozdělených podle exprese CD38 potvrzena nebyla (n = 70, p = 0,6687). Rozdíl mezi prognostickým významem koncentrace Ang-2 v plasmě nemocných a jeho expresí maligními lymfocyty je patrně způsoben expresí této molekuly jinými buňkami (např. endoteliálními) po autokrinní a parakrinní stimulaci jinými cytokiny, např. FGF-2 (Hegen et al. 2004). Nemocní s vysokou expresí Ang-2 analyzovaní v naší studii měli statisticky významně kratší dobu do progresu onemocnění. Tato analýza je však ovlivněna velkým zastoupením nemocných, kteří byli do studie přijati ve stádiu počínající progresu.

Endoglin, člen receptorového komplexu pro transformující růstový faktor beta, se účastní modulace signalizace prostřednictvím ligandu transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β), zejména buněčné proliferace a diferenciaci (Barbara, et al. 1999; Cheifetz, et al. 1992). Hraje však důležitou roli i v procesech vaskulárního remodelingu a angiogeneze. Zvýšená koncentrace solubilního endoglinu, odštěpené extracelulární domény endoglinu prostřednictvím metaloproteinázy MMP-14 (Takahashi, et al. 2001), byla zjištěna u řady pevných nádorů, ale i hematologických malignit (El-Gohary, et al. 2007; Gomez-Esquer, et al. 2004; Minhajat, et al. 2006; Nikiteas, et al. 2007; Takahashi, et al. 2001; Taskiran, et al. 2006). Důkazů o jeho působení u CLL je však velmi málo. Zvýšená exprese mRNA pro endoglin byla sice detekována v maligních lymfocytech CLL, tato analýza však byla provedena na velmi malém souboru nemocných a k jejím závěrům je třeba přistupovat velmi opatrně (Kay, et al. 2002). Zvýšená koncentrace endoglinu byla při porovnání se zdravými kontrolami potvrzena v plasmě nemocných s CLL. Tato koncentrace byla navíc vyšší u nemocných s progresivním onemocněním, pokročilým stádiem onemocnění a kratší dobou do zahájení léčby (Smolej, et al. 2008). Naše

práce prokázala statisticky významně vyšší expresi endoglinu v maligních lymfocytech nemocných s nemutovaným IGHV ($n = 80$, $p < 0,0001$), vysokou expresí ZAP 70 ($n = 70$, $p = 0,0076$), nepříznivým karyotypem ($n = 97$, $p = 0,0223$), progresivním průběhem onemocnění ($n = 97$, $p = 0,0003$) a pokročilým stádiem dle Raie ($n = 97$, $p < 0,0001$). Nemocní s vysokou expresí endoglinu měli statisticky významně kratší dobu celkového přežití i dobu do progresu, což odpovídá předcházejícím výsledkům měřícím koncentraci této molekuly v plazmě. Analýza doby do progresu je však, stejně jako v případě Ang-2, ovlivněna velkým zastoupením nemocných, kteří byli do studie přijati ve stádiu počínající progresu onemocnění. Tito nemocní navíc měli statisticky významně vyšší expresi endoglinu a ta byla tudíž s vysokou pravděpodobností vyšší než medián. Výsledky naší studie není možné podrobněji diskutovat s literaturou, neboť srovnatelné výsledky se v současné literatuře nevyskytují a naše práce je v této oblasti první.

Fibroblastový růstový faktor 2 je angiogenní molekula zodpovědná za řadu procesů včetně buněčné proliferace, tvorby nových cév i růst nádorů (Bikfalvi and Han 1994). U nemocných s CLL byla ve srovnání se zdravými kontrolami prokázána zvýšená koncentrace FGF-2 v plazmě (Aguayo, et al. 2000). Tato koncentrace klesla po léčbě fludarabinem (Smolej, et al. 2007) či kladribinem (Gora-Tybor, et al. 2002). Zvýšená koncentrace FGF-2 v plazmě byla zjištěna u nemocných s pokročilým stádiem onemocnění a zvýšeným přežíváním maligních buněk (Aguayo, et al. 2000; Bairey, et al. 2001; Konig, et al. 1997; Romanov, et al. 2005). Dřívější studie provedená na našem pracovišti prokázala vztah mezi zvýšenou koncentrací FGF-2 v plazmě a nemutovaným IGHV (Smolej, et al. 2006). Vztah mezi prognózou CLL a expresí mRNA pro FGF-2 v maligních lymfocytech však stále nebyl objasněn. Výsledky naší práce ukazují vysokou variabilitu exprese FGF-2 mezi maligními lymfocyty jednotlivých nemocných s CLL. Variabilní exprese však nemá statisticky významný vztah se studovanými prognostickými znaky kromě klinického stádia dle Raie ($n = 97$, $p = 0,0432$). Doba do progresu onemocnění i doba celkového přežití se u nemocných s CLL rozdělených podle exprese FGF-2 statisticky významně nelišily. FGF-2 v plazmě nemocných CLL je tedy patrně produkován (stejně jako v případě Ang-2) i jinými buňkami, které přispívají ke zvýšené koncentraci cirkulujícího FGF-2 a mohou působit prostřednictvím parakrinní stimulace maligních lymfocytů (Krejci et al. 2003). Exprese FGF-2 je navíc post-transkripčně regulována prostřednictvím exprese anti-sense genu NUDT6. (MacFarlane and Murphy 2010) Naše studie jako první prokázala, že exprese NUDT6 v maligních lymfocytech je velmi stabilní a nemůže být tudíž zodpovědná za variabilní koncentraci FGF-2 v těchto buňkách.

V naší práci jsme prokázali statisticky významný vztah mezi vysokou expresí Ang-2 a zejména endoglinu a nepříznivými prognostickými ukazateli CLL. Ačkoli pro potvrzení našich výsledků u těchto molekul bude zapotřebí rozsáhlejší studie s větším počtem nemocných, delší dobou sledování a analýzou nemocných v časném stádiu CLL, stávající výsledky ukazují, že angiogeneze hraje významnou úlohu v biologii a klinickém průběhu tohoto onemocnění a angiogenní molekuly (obzvláště endoglin) jsou tak slibnými molekulárními prognostickými znaky.

Závěry

1. Exprese Ang-2 v maligních lymfocytech nemocných s CLL je statisticky významně vyšší u nemocných s nemutovaným IGHV. Doba celkového přežití se u nemocných rozdělených do skupin podle exprese Ang-2 významně nelišila. Nemocní s vysokou expresí Ang-2 měli významně kratší dobu do léčby 1. linie. Získané výsledky rozšířily značně omezené poznatky, které jsou o této problematice v současné době k dispozici.
2. Gen pro endoglin byl statisticky významně více exprimován v maligních lymfocytech nemocných s CLL, kteří mají horší prognózou CLL určenou pomocí klasických (klinické stádium dle Raie a průběh onemocnění) i moderních prognostických ukazatelů (mutační stavu IGHV, exprese ZAP-70). U nemocných s vyšší expresí CD105 byla statisticky významně kratší doba celkového přežití i doby do progresu onemocnění. Práce zabývající se touto problematikou v takovémto rozsahu dosud zcela chyběla a výsledky naší studie ukazují, že exprese mRNA endoglinu v maligních lymfocytech CLL by mohla být v budoucnu používána jako laboratorně i finančně snadno dostupný prognostický ukazatel.
3. Kromě klinického stádia dle Raie se koncentrace transkriptu FGF-2 u nemocných rozdělených do skupin podle prognózy statisticky významně nelišila. Koncentrace FGF-2 neměla vliv ani na celkové přežití a čas do zahájení léčby 1. linie. Koncentrace proteinu FGF-2 v séru/plazmě nemocných je, jak ukázaly jiné práce, prognosticky významná. Podle výsledků této studie za to však není zodpovědná exprese FGF-2 samotnými maligními lymfocyty. Zároveň jsme jako první prokázali, že regulační transkript genu NUDT6 je v maligních lymfocytech CLL exprimován s velmi malou variabilitou a na vysoce variabilní koncentraci mRNA FGF-2 v těchto buňkách se tedy patrně nepodílí.

Použitá literatura

- AGUAYO, A., H. KANTARJIAN, T. MANSOURI, C. GIDEL, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, Sep 15 2000, 96(6), 2240-2245.
- AISENBERG, A. C. AND K. J. BLOCH Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. *N Engl J Med*, Aug 10 1972, 287(6), 272-276.
- BINET, J. L., A. AUQUIER, G. DIGHIRO, C. CHASTANG, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, Jul 1 1981, 48(1), 198-206.
- BURGER, J. A. Angiopoietin-2 in CLL. *Blood*, Jul 2010, 116(4), 508-509.
- CATOVSKY, D., J. FOOKS AND S. RICHARDS Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol*, Jun 1989, 72(2), 141-149.
- CRESPO, M., F. BOSCH, N. VILLAMOR, B. BELLOSILLO, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, May 1 2003, 348(18), 1764-1775.
- DAMESHEK, W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*, Apr 1967, 29(4), Suppl:566-584.
- DAMLE, R. N., T. WASIL, F. FAIS, F. GHIOTTO, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Sep 15 1999, 94(6), 1840-1847.
- DICKER, F., H. HERHOLZ, S. SCHNITTGER, A. NAKAO, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, Jan 2009, 23(1), 117-124.
- DOHNER, H., S. STILGENBAUER, M. R. JAMES, A. BENNER, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, Apr 1 1997, 89(7), 2516-2522.
- DUENSING, S. AND J. ATZPODIEN Increased intracellular and plasma levels of basic fibroblast growth factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Apr 1 1995, 85(7), 1978-1980.
- DURIG, J., M. NASCHAR, U. SCHMUCKER, K. RENZING-KOHLER, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, Jan 2002, 16(1), 30-35.
- EL-GOHARY, Y. M., J. F. SILVERMAN, P. R. OLSON, Y. L. LIU, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*, Apr 2007, 127(4), 572-579.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, Nov 18 1971, 285(21), 1182-1186.
- FRIESEL, R. E. AND T. MACIAG Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Jul 1995, 9(10), 919-925.

GALTON, D. A. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Canadian Medical Association Journal*, May 7 1966, 94(19), 1005-1010.

GOMEZ-ESQUER, F., D. AGUDO, F. MARTINEZ-ARRIBAS, M. J. NUNEZ-VILLAR, et al. mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer. *Anticancer research*, May-Jun 2004, 24(3a), 1581-1585.

GORA-TYBOR, J., J. Z. BLONSKI AND T. ROBAK Cladribine decreases the level of angiogenic factors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*, 2002, 49(3), 145-148.

HALLEK, M., K. FISCHER, G. FINGERLE-ROWSON, A. M. FINK, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, Oct 2 2010, 376(9747), 1164-1174.

HALLEK, M., B. D. CHESON, D. CATOVSKY, F. CALIGARIS-CAPPIO, et al. 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*, Jun 15 2008, 111(12), 5446-5456.

HAMBLIN, T. J., Z. DAVIS, A. GARDINER, D. G. OSCIER, et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Sep 15 1999, 94(6), 1848-1854.

HAMBLIN, T. J., J. A. ORCHARD, R. E. IBBOTSON, Z. DAVIS, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, Feb 1 2002, 99(3), 1023-1029.

HOLASH, J., P. C. MAISONPIERRE, D. COMPTON, P. BOLAND, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, Jun 18 1999, 284(5422), 1994-1998.

HUTTMANN, A., L. KLEIN-HITPASS, J. THOMALE, R. DEENEN, et al. Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukaemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. *Leukemia*, Oct 2006, 20(10), 1774-1782.

CHAN, A. C., M. IWASHIMA, C. W. TURCK AND A. WEISS ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, Nov 13 1992, 71(4), 649-662.

CHEIFETZ, S., T. BELLON, C. CALES, S. VERA, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, Sep 25 1992, 267(27), 19027-19030.

CHEN, L., J. APGAR, L. HUYNH, F. DICKER, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Mar 1 2005, 105(5), 2036-2041.

CHEN, L., G. WIDHOPF, L. HUYNH, L. RASSENTI, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Dec 15 2002, 100(13), 4609-4614.

IBRAHIM, S., M. KEATING, K. A. DO, S. O'BRIEN, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jul 1 2001, 98(1), 181-186.

IMANISHI, Y., B. HU, G. XIAO, X. YAO, et al. Angiopoietin-2, an angiogenic regulator, promotes initial growth and survival of breast cancer metastases to the lung through the integrin-linked kinase (ILK)-AKT-B cell lymphoma 2 (Bcl-2) pathway. *The Journal of biological chemistry*, Aug 19 2011, 286(33), 29249-29260.

- KAY, N. E., N. D. BONE, R. C. TSCHUMPER, K. H. HOWELL, et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*, May 2002, 16(5), 911-919.
- KROBER, A., T. SEILER, A. BENNER, L. BULLINGER, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Aug 15 2002, 100(4), 1410-1416.
- MACFARLANE, L. A. AND P. R. MURPHY Regulation of FGF-2 by an endogenous antisense RNA: effects on cell adhesion and cell-cycle progression. *Molecular carcinogenesis*, Dec 2010, 49(12), 1031-1044.
- MAFFEI, R., R. MARASCA, S. MARTINELLI, I. CASTELLI, et al. Angiopoietin-2 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical outcome and immunoglobulin heavy-chain mutational status. *Leukemia*, Jun 2007, 21(6), 1312-1315.
- MAFFEI, R., S. MARTINELLI, I. CASTELLI, R. SANTACHIARA, et al. Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leuk Res*, Mar 2010a, 34(3), 312-321.
- MAFFEI, R., S. MARTINELLI, R. SANTACHIARA, D. ROSSI, et al. Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Jul 29 2010b, 116(4), 584-592.
- MARASCA, R., R. MAFFEI, S. MARTINELLI, S. FIORCARI, et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol*, Jun 2013, 31(2), 88-95.
- MARTINELLI, S., R. MAFFEI, I. CASTELLI, R. SANTACHIARA, et al. Increased expression of angiopoietin-2 characterizes early B-cell chronic lymphocytic leukemia with poor prognosis. *Leukemia Research*, Apr 2008, 32(4), 593-597.
- MENZEL, T., Z. RAHMAN, E. CALLEJA, K. WHITE, et al. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood*, Feb 1 1996, 87(3), 1056-1063.
- MESSMER, B. T., D. MESSMER, S. L. ALLEN, J. E. KOLITZ, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation*, Mar 2005, 115(3), 755-764.
- MINHAJAT, R., D. MORI, F. YAMASAKI, Y. SUGITA, et al. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathology International*, Dec 2006, 56(12), 717-723.
- MINOT, G. B. AND R. ISAACS Lymphatic Leukemia; Age Incidence, Duration, and Benefit Derived from Irradiation. *The Boston Medical and Surgical Journal*, 1924, 191(1), 1-9.
- MOLICA, S., G. CUTRONA, G. VITELLI, R. MIRABELLI, et al. Markers of increased angiogenesis and their correlation with biological parameters identifying high-risk patients in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, Nov 2007, 31(11), 1575-1578.
- MOLICA, S., A. VACCA, D. RIBATTI, A. CUNEO, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Nov 1 2002, 100(9), 3344-3351.
- NIKITEAS, N. I., N. TZANAKIS, G. THEODOROPOULOS, V. ATSAVES, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2007, 10(1), 12-17.

PEREZ-ATAYDE, A. R., S. E. SALLAN, U. TEDROW, S. CONNORS, et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *The American journal of pathology*, Mar 1997, 150(3), 815-821.

PETERSON, L. AND A. R. KINI Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Apr 15 2001, 97(8), 2529.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Staženo z: <http://www.R-project.org/>.

RAI, K. R., A. SAWITSKY, E. P. CRONKITE, A. D. CHANANA, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Aug 1975, 46(2), 219-234.

ROCHE LIFE SCIENCE. Universal ProbeLibrary Assay Design Center [online]. 2008. [citováno dne Sep 20 2008]. Dostupné z: <http://www.universalprobelibrary.com>.

ROSENWALD, A., A. A. ALIZADEH, G. WIDHOPF, R. SIMON, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, Dec 3 2001, 194(11), 1639-1647.

ROSSI, D., M. CERRI, C. DEAMBROGI, E. SOZZI, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*, Feb 1 2009, 15(3), 995-1004.

SARFATI, M., S. CHEVRET, C. CHASTANG, G. BIRON, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Dec 1 1996, 88(11), 4259-4264.

SCIELZO, C., A. CAMPOREALE, M. GEUNA, M. ALESSIO, et al. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia*, Apr 2006, 20(4), 689-695.

SCHROEDER, H. W., JR. AND G. DIGHIRO The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunology Today*, Jun 1994, 15(6), 288-294.

SCHULZ, P., C. FISCHER, K. M. DETJEN, S. RIEKE, et al. Angiopoietin-2 drives lymphatic metastasis of pancreatic cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Oct 2011, 25(10), 3325-3335.

SMOLEJ, L., C. ANDRYS, D. BELADA, M. HRUDKOVA, et al. Plazmaticke koncentrace solubilniho endoglinu maji prognosticky vyznam u nemocnych s chronickou lymfocytarni leukemii [Plasma levels of soluble endoglin have prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia]. *Transfuze Hematol. dnes*, 2008, 14(1), 24-27.

SMOLEJ, L., C. ANDRYS, J. KREJSEK, D. Z. BELADA, et al. Bazicky fibroblastovy rustovy faktor (bFGF) a cevni endotelovy rustovy faktor (VEGF) jsou zvyšeny v plazme periferni krve nemocnych s chronickou lymfocytarni leukemii a klesaji po intenzivni lecbě obsahující fludarabin [Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are elevated in peripheral blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and decrease after intensive fludarabine-based treatment]. *Vnitřní lékařství*, Nov 2007, 53(11), 1171-1176.

SMOLEJ, L., C. ANDRYS, S. PEKOVA, J. SCHWARZ, et al. Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, Oct 2006, 91(10), 1432-1433.

STILGENBAUER, S., P. LICHTER AND H. DOHNER Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Reviews in clinical and experimental hematology*, Mar 2000, 4(1), 48-72.

- TAM, C. S., T. D. SHANAFELT, W. G. WIERDA, L. V. ABRUZZO, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*, Jul 30 2009, 114(5), 957-964.
- TASKIRAN, C., O. ERDEM, A. ONAN, O. ARISOY, et al. The prognostic value of endoglin (CD105) expression in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, Sep-Oct 2006, 16(5), 1789-1793.
- THORNTON, P. D., C. FERNANDEZ, G. M. GIUSTOLISI, R. MORILLA, et al. CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J*, 2004, 5(2), 145-151.
- TILL, K. J., D. G. SPILLER, R. J. HARRIS, H. CHEN, et al. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood*, Jun 15 2005, 105(12), 4813-4819.
- TOBIN, G., U. THUNBERG, A. JOHNSON, I. THORN, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Mar 15 2002, 99(6), 2262-2264.
- VRBACKY, F., L. SMOLEJ, V. VROBLOVA, S. PEKOVA, et al. Angiopoietin-2 mRNA expression is increased in chronic lymphocytic leukemia patients with poor prognostic features. *Hematology*, Aug 2010, 15(4), 210-214.
- ZENZ, T., D. VOLLMER, M. TRBUSEK, J. SMARDOVA, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, Dec 2010, 24(12), 2072-2079.

Přehled publikační činnosti

Původní vědecké publikace s IF

VRBACKY F., SMOLEJ L., VROBLOVA V., PEKOVA S., HRUDKOVA M., CERVINKA M., PECKA M., KREJSEK J., MALY J.: Angiopoietin-2 mRNA expression is increased in chronic lymphocytic leukemia patients with poor prognostic features. *Hematology*, 2010, 15(4), 210-214. **IF 1,333**

VROBLOVA V., VRBACKY F., HRUDKOVA M., JANKOVICOVA K., SCHMITZOVA D., MALY J., KREJSEK J., SMOLEJ L.: Significant change of ZAP-70 expression during the course of chronic lymphocytic leukemia. *Eur. J. Haematol.*, 2010, 84(6), 513-517. **IF 2,237**

VRBACKY F., NEKVINDOVA J., REZACOVA V., SIMKOVIC M., MOTYCKOVA M., BELADA D., PAINULY U., JIRUCHOVA Z., MALY J., KREJSEK J., ZAK P., CERVINKA M., SMOLEJ L.: Prognostic relevance of angiopoietin-2, fibroblast growth factor-2 and endoglin mRNA expressions in chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*, 2014, 61(5), 585-92. **IF 1,642**

KACEROVSKY M., VRBACKY F., KUTOVA R., PLISKOVA L., ANDRYS C., MUSILOVA I., MENON R., LAMONT R., NEKVINDOVA J.: Cervical microbiota in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS One*, 2015, 10(5), e0126884. **IF 3,234**

Ostatní publikace v časopisech s IF - přehledové články

ŠIMKOVIČ M., VODÁREK P., MOTYČKOVÁ M., BELADA D., VRBACKÝ F., ŽÁK P., SMOLEJ L.: Venous thromboembolism in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Thrombosis Research*, 2015, 136(6), 1082-1086. **IF 2,447**

Kazuistiky, apod.

KOSTAL M., ZAK P., VEJRAZKOVA E., CERMANOVA M., BELOHLAVKOVA P., ZAVRELOVA A., VRBACKY F., ROZKOS T., NOVA M.: Case 2-2012: a 57-year-old woman with post-transplant lymphoproliferative disorder after allogeneic stem cell transplantation for primary myelofibrosis. *Acta Medica*, 2012, 55(3), 142-5.

Kapitoly v monografiích

VOGLOVÁ J., KAŠPAROVÁ P., VRBACKÝ F.: Klinický obraz, diagnostika a diferenciální diagnostika. In *Chronická myeloidní leukémie*. Praha: Galén, 2010. Kapitola 5, s. 51-64. ISBN 978-80-7262-680-9.

PECKA, M., **VRBACKÝ, F.**: Reologické vlastnosti biologických tekutin. In Praktická hematologie. Laboratorní metody. Český Těšín: Nakladatelství Infiniti art s.r.o., 2010. Kapitola 3, s. 59- 66. ISBN 78-80-903871-9-5.

VRBACKÝ, F.: Cytogenetické a molekulárně genetické metody. In Praktická hematologie. Laboratorní metody. Český Těšín: Nakladatelství Infiniti art s.r.o., 2010. Kapitola 6.4, s. 311-321. ISBN 978-80-903871-9-5.

Ostatní publikace v časopisech bez IF

VROBLOVA V., SMOLEJ L., **VRBACKY F.**, JANKOVICOVA K., HRUDKOVA M., MALY J., KREJSEK J.: Biological Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic leukemia. Acta Medica, 2009, 52(1), 3-8.

KOSTAL M., DULICEK P., KRAJICKOVA D., EHLER E., **VRBACKY F.**, MALY J.: Cerebral venous thrombosis and its relation to female sexual hormones. Gynekolog, 2009, 18(5), 176-180.

ŽÍDKOVÁ M., VOGLOVÁ J., BĚLOHLÁVKOVÁ P., **VRBACKÝ F.**: Novinky v klasifikaci MDS a stanovení prognózy dle WPSS. Trans. Hemat. dnes, 2010, 16(1), 42-46.