

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Vnitřní nemoci

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

**Complex evaluation of immune defects in patients with
chronic lymphocytic leukemia**

MUDr. Pavel Vodárek

Školitel: doc. MUDr. David Belada, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Prohlášení autora

Prohlášení:

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

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

Hradec Králové, 2023

MUDr. Pavel Vodárek

Poděkování

Za vedení a podporu při studiu bych rád poděkoval svému školiteli, doc. MUDr. Davidu Beladovi, Ph.D. a také prof. MUDr. Pavlu Žákovi, Ph.D. a prof. MUDr. Lukáši Smolejovi, Ph.D. Dále chci poděkovat lékařům, kteří mi pomáhali s nábořem nemocných do studie, zejména MUDr. Martinu Šimkovičovi, Ph.D., MUDr. Monice Motyčkové, Ph.D., MUDr. Vladimíře Čapounové a MUDr. Dominice Écsiové. Pak také pracovníkům Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kteří prováděli laboratorní vyšetření, tedy prof. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D., Mgr. Vladimíře Řezáčové, Ph.D., RNDr. Ondřeji Součkovi, Ph.D. a PharmDr. Doris Vokurkové, Ph.D.

V neposlední řadě patří velký dík sestřám ambulance a lůžkových oddělení IV. interní hematologické kliniky, které prováděli odběry do studie a samozřejmě také pacientům, bez jejichž ochoty by tato práce nikdy nevznikla.

Obsah

1. Obsah	4
2. Seznam použitých zkratek	6
3. Souhrn / Summary	8
4. Úvod	10
4.1. Chronická lymfocytární leukémie – základní klinická charakteristika	10
4.2. Poruchy specifické humorální imunity – hypogamaglobulinémie	12
4.2.1. Souvislost hypogamaglobulinémie s prognózou a výskytem infekcí	13
4.2.2. Vliv léčby na koncentrace imunoglobulinů	17
4.3. Poruchy specifické buněčné imunity	19
4.3.1. Vliv léčby na populace T-lymfocytů	23
4.4. Poruchy nespecifické imunity	25
4.4.1. Vliv léčby na nespecifickou imunitu	28
5. Cíle disertační práce	31
6. Metody a soubor nemocných	32
6.1. Laboratorní metody	33
6.1.1. Analýza buněčných populací průtokovou cytometrií	33
6.1.2. Analýza sérových koncentrací imunoglobulinů	34
6.2. Statistické zpracování	34
6.3. Charakteristika souboru nemocných	35
7. Výsledky	39
7.1. Sérové koncentrace imunoglobulinů	39
7.1.1. Vliv aktivity choroby a léčby 1. linie na koncentrace imunoglobulinů	40
7.1.2. Souvislost koncentrací imunoglobulinů a infekčních komplikací	42
7.1.3. Prognostický význam sérových koncentrací imunoglobulinů	44
7.1.4. Souvislost sérových koncentrací imunoglobulinů a prognostických ukazatelů	46
7.2. Buněčné populace	46
7.2.1. Poměry zastoupení buněčných populací a jejich prognostický význam	46
7.2.2. Změny jednotlivých buněčných populací při progresi onemocnění	48
7.2.3. Změny buněčných populací v důsledku léčby 1. linie.	54

7.2.4. Srovnání vlivu různých léčebných režimů na buněčné populace	62
7.2.5. Souvislost počtů buněk a infekčních komplikací	65
7.2.6. Prognostický význam počtů buněk	66
7.2.7. Souvislost počtů buněk a prognostických ukazatelů	72
8. Diskuze	75
8.1. Sérové koncentrace imunoglobulinů	75
8.1.1. Koncentrace imunoglobulinů jsou nižší u nemocných s progredující CLL	75
8.1.2. Po léčbě včetně CHIT může docházet k vzestupu koncentrací IgA	75
8.1.3. Souvislost mezi hypogamaglobulinémií, infekcemi a prognózou nemocných	77
8.1.4. Souvislost koncentrací imunoglobulinů a prognostických ukazatelů	77
8.2. Buněčné populace	79
8.2.1. Poměry zastoupení buněčných populací a jejich prognostický význam	79
8.2.2. Změny jednotlivých buněčných populací při progresi onemocnění	79
8.2.3. Změny buněčných populací v důsledku léčby 1. linie.	81
8.2.4. Srovnání vlivu různých léčebných režimů na buněčné populace	82
8.2.5. Souvislost počtů buněk a infekčních komplikací	83
8.2.6. Prognostický význam počtů buněk	84
8.2.7. Vztah počtů buněk a prognostických ukazatelů	85
9. Závěry	87
10. Seznam použité literatury	89
11. Přílohy	111
11.1. Určení klinického stadia dle Raie	111
11.2. Indikace k zahájení léčby CLL	111
11.3. Dávkování režimů CHIT	112

2. Seznam použitých zkratk

CLL - Chronická lymfocytární leukémie

ČR – Česká republika

IGHV – geny pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinů

TP53 - nádorový protein 53

del 11q – delece 11q chromozomu

del 13q – delece 13q chromozomu

del 17p – delece 17p chromozomu

tri 12 – trisomie 12 chromozomu

PFS – přežití bez progresu

OS – celkové přežití

FCR – fludarabin, cyklofosfamid, rituximab

BR – bendamustin, rituximab

R-Clb – rituximab, chlorambucil

O-Clb – obinutuzumab, chlorambucil

CHIT – chemoimunoterapie

BTKi – inhibitor(y) Brutonovy tyrosinkinázy

NCCN – National Comprehensive Cancer Network

ESMO – European Society for Medical Oncology

Ig – imunoglobulin

B-ly – B-lymfocyt

T-ly – T-lymfocyt

TFS – přežití bez léčby

TTFT – čas do první léčby

MBL – monoklonální B-lymfocytóza

CMV – cytomegalovirus

TCM – centrální paměťové T-lymfocyty

TEM – efektorové paměťové T-lymfocyty

TEMRA – terminálně diferencované efektorové T-lymfocyty

T-reg – regulační T-lymfocyty

IL – interleukin

TGF- β – transforming growth factor β

APC – antigen prezentující buňka

IFN γ – interferon γ

TNF α – tumor necrosis factor α

PD-1 – programmed death 1

PD-L1 – programmed death ligand 1

NK – natural killer

MRD – měřitelná (dříve minimální) reziduální choroba

MDSC – myeloid-derived supressor cells

NLC – nurse-like cells

IWCLL – International Workshop on CLL

FISH – fluorescenční in situ hybridizace

TTNT – čas do další léčby

ROC – Receiver Operating Characteristic

3. Souhrn

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

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

3. Summary

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

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

4. Úvod

4.1. Chronická lymfocytární leukémie – základní klinická charakteristika

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější leukémií dospělé populace v západním světě, kde tvoří asi 30% všech leukémií, naopak v Asii je velmi vzácná (1). Medián věku v době diagnózy se pohybuje mezi 65 a 72 lety a asi dvakrát častěji postihuje muže (1). Incidence v České republice (ČR) je 4,3 případy na 100 000 nemocných za rok, celosvětově se jedná o 191 000 nových případů a asi 60 000 úmrtí ročně (data za rok 2015) (2, 3). Prevalence je vzhledem k dlouhodobému přežívání nemocných podstatně vyšší, v ČR 63/100 000 nemocných (2). V průběhu choroby dochází k akumulaci klonálních lymfocytů s typickým imunofenotypem (CD5⁺, CD19⁺, CD23⁺) v kostní dřeni, periferní krvi a lymfatických orgánech, tedy zejména v lymfatických uzlinách, slezině a event. v játrech (3, 4). Klinickým projevem je lymfocytóza (jako taková téměř vždy bezpříznaková), cytopenie (obvykle anémie a / nebo trombocytopenie), organomegalie s možnými příznaky z útlaku okolních orgánů a případně B-příznaky – noční pocení, teploty, hubnutí a výrazná únava.

Průběh choroby a prognóza nemocných jsou velmi variabilní – někteří pacienti umírají brzy po diagnóze, zatímco jiní přežívají i bez jakékoliv léčby řadu let (6). Z toho důvodu bylo již popsáno mnoho prognostických ukazatelů, které pomohou odhadnout agresivitu choroby. K nejdůležitějším patří mutační stav genů pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinů (immunoglobulin heavy chain variable region, IGHV), stav genu pro nádorový protein 53 (tumour protein 53, *TP53*) a pro CLL typické chromozomální aberace – delece chromozomů 11q (del 11q), 13q (del 13q) a 17p (del 17p) a trisomie chromozomu 12 (tri 12) (6). Nemocní s nemutovanými IGHV geny mají obecně výrazně horší prognózu. V původní práci Hamblina měli takoví pacienti medián přežití 117 měsíců, zatímco pacienti s mutovanými IGHV geny 293 měsíců (7). Nepříznivý prognostický význam nemutovaných IGHV genů navíc zřejmě trvá i v éře cílené léčby, jak ukazují např. data ze studie CLL13 (7). Pacienti s nemutovanými IGHV zde měli horší období přežití bez progrese (progression free survival, PFS) napříč všemi rameny léčby včetně trojkombinace venetoklax, ibrutinib a obinutuzumab (8). Ještě horší prognózu znamená pro pacienty s CLL i porucha funkce genu *TP53*, ať už v důsledku mutace vedoucí k dysfunkci genu, či v důsledku ztráty krátkého raménka chromozomu 17, kde se tento gen nalézá (9, 10). Také zde platí, že ani nová cílená léčba není zcela schopna překonat nepříznivý prognostický význam těchto změn a pacienti s del 17p či mutací *TP53* mají kratší PFS (11-13).

Ke klasickým prognostickým znakům patří i systémy stanovení stádia choroby dle Raie a Bineta (v této práci je dále používán systém Raie, viz příloha 11.1.) (4, 14).

Dosud nebyl prokázán přínos časného zahájení léčby CLL ve smyslu prodloužení celkového přežití (overall survival, OS), proto jsou nemocní s bezpříznakovým, nebo mírným průběhem choroby pouze sledováni (15-18). Léčba je pak zahájena při splnění alespoň jednoho z indikačních kritérií, mezi která patří cytopenie (anémie s hemoglobinem < 100 g/l nebo trombocytopenie < 100 000/ul), masivní, progresivní či symptomatická organomegalie, zdvojovací čas lymfocytů < 6 měsíců nebo vzestup počtu o lymfocytů o > 50 % za < 2 měsíce, autoimunitní komplikace nereagující na léčbu kortikosteroidy a výrazné B příznaky (podrobně viz příloha 11.2.) (19).

V první linii léčby byl pro mladé nemocné (přibližně do 65 let věku) bez významných komorbidit dlouho standardem léčby režim FCR (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab) (20). Pro starší nemocné lze použít režim BR (bendamustin, rituximab), který je o něco méně efektivní, ale zároveň také méně toxický (21). Nemocní vysokého věku nebo ti s významnými komorbiditami mohou být v první linii léčení kombinací chlorambucilu s anti-CD20 monoklonální protilátkou (režimy R-Clb – rituximab, chlorambucil, a O-Clb – obinutuzumab, chlorambucil) (22). V poslední dekádě je nicméně i v první linii léčby patrný posun od výše uvedených režimů chemoimunoterapie (CHIT) směrem k cílené léčbě, tedy zejména inhibitorům Brutonovy tyrosinkinázy (BTKi), nebo venetoklaxu (23-26). V podmínkách úhradových omezení v ČR a také jinde v Evropě jsou však režimy CHIT v některých situacích stále užívány (27). Konkrétně v ČR není v první linii léčby v současnosti (říjen 2022) žádný z cílených léků hrazen u nemocných vhodných k CHIT (tedy mladých a bez významných komorbidit), bez del 17p či mutace *TP53*. U takovýchto nemocných, pokud zároveň nemají další prognosticky nepříznivé znaky (nemutované IGHV, del 11q), navíc nebyl vyšší efekt BTKi ve srovnání s režimem FCR prokázán (23). Všechny uvedené režimy CHIT (FCR, BR, R-Clb, O-Clb) stále udávají jako přijatelné možnosti léčby první linie při nepřítomnosti del 17p nebo mutace *TP53* i Česká doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie (19). Kromě R-Clb jsou také stále možnou alternativou cílené léčby dle aktuálních verzí doporučení NCCN (National Comprehensive Cancer Network) a ESMO (European Society for Medical Oncology) (28, 29). V doporučeních NCCN je režim FCR řazen jako preferovaný pro pacienty mladší 65 let bez komorbidit s mutovanými IGHV, bez del 17p / mutace *TP53*, režimy BR a O-

Clb jako další doporučené režimy (tedy slabší doporučení než “preferovaný režim“) pro obdobné nemocné starší 65 let, nebo s komorbiditami (28). Režim R-Clb již není dle NCCN doporučován. V doporučeních ESMO jsou také zmíněny FCR, BR a O-Clb v obdobných indikacích, zároveň jsou všechny režimy CHIT doporučeny pouze jako alternativa k cílené léčbě ve chvíli, kdy pro to existuje specifický důvod, či není cílená léčba k dispozici (29).

Dalším typickým rysem CLL je komplexní alterace imunitního systému nemocných. K té dochází jednak primárně vlivem choroby, jednak sekundárně vlivem léčby. Důsledkem je progresse choroby samotné, rozvoj autoimunitních komplikací, vyšší výskyt dalších malignit a zejména pak vyšší riziko infekcí (30-33). Mezi nejdůležitější autoimunitní komplikace patří autoimunitní hemolytická anémie, která postihuje až 35% nemocných s CLL, vzácněji se pak vyskytují imunitní trombocytopenie, čistá aplazie červené řady a raritně např. také Sjögrenův syndrom, nefrotický syndrom nebo bulózní pemphigoid (31). Porucha imunitního dozoru je zřejmě příčinou vyššího výskytu nemelanomových kožních nádorů a karcinomu plic u nemocných s CLL, u řady dalších nádorů je souvislost méně jednoznačná (32). Infekce jsou nejčastější příčinou morbidit i mortality nemocných s CLL – infekci prodělá v průběhu onemocnění okolo 80 % pacientů a je až v 60 % případů příčinou jejich smrti (34). Lze předpokládat, že imunitní změny se rozvíjejí postupně s progresí choroby a následně vlivem podané terapie. V časných fázích CLL, kdy nemocný není léčen, ještě nebývají výrazné. Takových pacientů je v současnosti v době diagnózy většina (35). V pokročilých stádiích CLL můžeme očekávat hlubší poruchy imunity a může být problematické odlišit imunodeficit související se základním onemocněním od změn navozených léčbou.

4.2. Poruchy specifické humorální imunity - hypogamaglobulinémie

Nejdéle známým defektem imunity u CLL je hypogamaglobulinémie, popisovaná již od 60. let minulého století (36). Její prevalence u neléčené CLL se v různých studiích pohybuje v rozmezí 9,9-34,7 % pro imunoglobulin (Ig) G, 12-29,5 % pro IgA a 14,8-54 % pro IgM (37-45). Mechanismus rozvoje hypogamaglobulinémie u pacientů s CLL je komplexní. Bylo popsáno působení autologních NK buněk na plazmatické buňky v kostní dřeni (46). V úvahu připadá také cytotoxický vliv samotných CLL buněk na plazmatické buňky prostřednictvím interakce mezi Fas ligandem na CLL buňkách a Fas receptorem na plazmocytech (47). Criado et al. popsali přímou korelaci mezi koncentracemi Ig a kvantitou residuálních normálních (neklonálních) B-lymfocytů (B-ly) v periferní krvi (48). Významnou, ne-li rozhodující roli hrají

pravděpodobně i defekty T-lymfocytů (T-ly) a související omezená schopnost rozvoje sekundární imunitní odpovědi, jak je popsáno dále v této práci.

4.2.1. Souvislost hypogamaglobulinémie s prognózou a výskytem infekcí

Ve studiích Rozmana, Andersena a Crassiniho byla zjištěna souvislost nižší koncentrace IgG s kratším OS (40, 41, 49). V řadě dalších prací se ale toto pozorování nepotvrdilo (37-39, 42, 43, 50, 51). Častěji byla pozorována asociace mezi krátkým OS a nízkou koncentrací IgA (40, 41, 43). Nicméně ani to nebylo potvrzeno ve všech studiích (37, 39, 42, 51). Pouze Andersen et al. pozorovali kratší OS u nemocných s deficitem IgM, zatímco ostatní nikoliv (37, 39-43, 49, 51). Některé z těchto studií zkoumaly i spojitost mezi nízkými koncentracemi Ig a kratším přežitím bez léčby (treatment free survival, TFS), nebo časem do první léčby (time to first treatment, TTFT). Parikh et al. zjistili takovou souvislost s koncentrací IgG (nezkoumali ale ostatní třídy Ig), Crassini et al. s koncentracemi IgG, IgM, IgG3 a IgG4, Andersen et al. s koncentrací IgM a většina ostatních s IgA (37, 38, 41-43, 49, 50). V pracích Singha a Francise se podobnou souvislost prokázat nepodařilo (39, 51).

Řada výše citovaných studií hledala také souvislost mezi koncentracemi Ig a výskytem infekcí a výsledky byly podobně rozporuplné. Neprůkazné byly v tomto směru výzkumy Crassiniho a studie Andersena z roku 2016 (41, 49). V následně publikované rozsáhlejší analýze (1204 dosud neléčených pacientů) už ale Andersen et al. pozorovali vyšší riziko infekcí při nízkém IgG, IgA i IgM v univariantní analýze, u IgA pak i v multivariantní analýze (45). V práci kolektivu Andrey Visentin byla vyšší frekvence závažných infekcí (takových, které vyžadovaly hospitalizaci nebo intravenózní antibiotickou terapii) jednak u nemocných po léčbě a dále také u těch s kombinovaným deficitem IgG a navíc buď IgA, nebo IgM (52). Také Hensel, Francis a Freeman popsali vyšší výskyt infekcí u nemocných s hypogamaglobulinémií (zde byla část nemocných již předléčených, na rozdíl od ostatních citovaných studií) (51, 53, 54). V další studii s 899 nemocnými s CLL ve stadiu A dle Bineta sice nebyl pozorován vliv koncentrací Ig v době diagnózy na výskyty infekcí, ty ale byly významně častější u pacientů, u nichž se hypogamaglobulinémie rozvinula až v průběhu sledování (37). Ishdorj et al. zjistili nepřímou souvislost mezi koncentracemi Ig a infekcemi, kdy deficit IgG, nebo IgA byly nezávislým prediktorem budoucí potřeby substituční terapie Ig (43). Ačkoliv tedy nejsou data jednotná, převažují důkazy pro souvislost hypogamaglobulinémie a infekcí, a to zejména u třídy IgA.

Nejdůležitější studie zabývající se prognostickým významem hypogamaglobulinémie a souvislostí s infekcemi u nemocných s CLL jsou shrnuty v tabulce 1.

Jak vyplývá ze sporné souvislosti koncentrace Ig s výskytem infekcí, samotná hypogamaglobulinémie nemusí nutně vést k jejich vyššímu výskytu a naopak nemocní s normálními koncentracemi imunoglobulinů rekurentními infekty trpět mohou (55). Vysvětlení spočívá mimo jiné v neadekvátní schopnosti B-lymfocytů rozvinout imunitní odpověď na specifické patogeny (55). To se pak odráží v nedostatečné odpovědi nemocných s CLL na vakcinaci, včetně konjugovaných vakcín. Ty jsou sice efektivnější než polysacharidové, přesto i zde je odpověď ve srovnání se zdravou populací horší. Například odpověď (dvojnásobný vzestup titru specifických protilátek) na konjugovanou trináctivalentní pneumokokovou vakcínu byla pozorována jen u 58,3 % nemocných s CLL ve srovnání se 100 % u zdravých kontrol (56). Větší účinnost konjugovaných vakcín ve srovnání s polysacharidovými byla potvrzena i randomizovanou studií, kde se dále ukázalo, že efektivita vakcinace klesá s délkou trvání základního onemocnění a je také nižší při nižších koncentracích Ig – pacienti s $IgG < 4,9 \text{ g/l}$ neměli odpověď na žádný sérotyp v žádné z testovaných vakcín. (57).

S hypogamaglobulinémií jsou spojovány zejména respirační infekce, přičemž typickými patogeny jsou opouzdřené bakterie – *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, nebo *Staphylococcus aureus* (58).

Tabulka 1. Nejdůležitější studie zabývající se prognostickým významem hypogamaglobulinémie a souvislostí s infekcemi u nemocných s CLL.

studie	studovaná populace	závěr studie
Rozman et al., 1988 (40)	neléčení pacienti v době diagnózy, n = 247	kratší OS při deficitu IgA a IgG v univariantsní analýze, IgA i v multivariantsní analýze
Hensel et al., 2003 (53)	187 pacientů s CLL, z toho 95 dosud neléčených	vyšší frekvence infekcí při deficitu celkových Ig, ale jen v univariantsní analýze; bez vlivu jednotlivých tříd Ig
Francis et al., 2006 (51)	Retrospektivní analýza 280 pacientů, z toho 155 dosud neléčených	vyšší frekvence infekcí při deficitu IgG, IgA i IgM, bez vlivu na TTFT a OS
Freeman et al., 2013 (54)	150 pacientů s CLL, z toho 107 dosud neléčených	vyšší frekvence infekcí při deficitu IgG3 a IgG4, hraničně i IgG1
Shvidel et al., 2014 (42)	neléčení pacienti ve stadiu Binet A, n = 857	kratší TFS pouze při deficitu IgA, ale jen v univariantsní analýze
Visentin et al., 2015 (52)	706 pacientů s CLL, 40 % již léčených	vyšší frekvence infekcí při kombinovaném deficitu IgG a navíc buď IgA, nebo IgM a to i v multivariantsní analýze
Parikh et al., 2015 (38)	neléčení pacienti v době diagnózy, n = 1486	kratší TTFT při deficitu IgG, bez vlivu IgG na OS, ostatní Ig nestudovány
Andersen et al., 2016 (41)	neléčení pacienti v době diagnózy, n = 159	kratší OS při deficitu IgG, IgA i IgM a kratší TFS při deficitu IgM, vše pouze v univariantsní analýze; bez vlivu na frekvenci infekcí
Mauro et al., 2017 (37)	neléčení pacienti v době diagnózy ve stadiu Binet A, n = 899	bez vlivu IgA, IgG, či IgM v době diagnózy na OS / frekvenci infekcí, vyšší riziko infekcí při rozvoji deficitu IgG při sledování, kratší TFS při deficitu IgA
Andersen et al., 2018 (45)	neléčení pacienti, n = 1204	vyšší frekvence infekcí při deficitu IgA, IgG i IgM v univariantsní analýze, IgA i v multivariantsní analýze
Crassini et al., 2018 (49)	stejná populace jako Freeman et al., 2013 (54), s delším follow-upem	kratší OS při deficitu IgG, IgG1 a IgG3 a TFS při deficitu IgG, IgM, IgG3 a IgG4, vše pouze v univariantsní analýze
Ishdorj et al., 2019 (43)	neléčení pacienti v době diagnózy, n = 511 (13 % mělo jen monoklonální B-lymfocytózu)	zkrácené OS a TTFT při deficitu IgA, a to i v multivariantsní analýze
Singh et al., 2020 (39)	neléčení pacienti, většinou v době diagnózy, n = 150	není vliv IgG, IgA, nebo IgM na TTFT, nebo OS
Corbigni et al., 2020 (50)	neléčení pacienti, n = 1505	kratší TTFT při IgA < 0,82 g/l a při jakékoliv hypogamaglobulinémii, bez vlivu Ig na OS

Pouze několik málo studií se soustředilo na případnou souvislost hypogamaglobulinémie a známých prognostických faktorů. Mauro et al. nenašli u nemocných s CLL souvislost mezi nízkou hladinou Ig a věkem, pohlavím, hladinou $\beta 2$ mikroglobulinu, pozitivitou ZAP70, nemutovanými IGHV ani prognosticky nepříznivými chromozomálními aberacemi (37). Nízká hladina IgA zde ale byla častější u nemocných se splenomegalií a s pozitivitou CD38 a nízká hladina IgM u těch s vyšším celkovým počtem lymfocytů a ve stádiích 0, I a II dle Raie. Parikh et al. pozorovali nižší IgG u pacientů s vyšší expresí CD49d, s tri 12 a ve stádiích III a IV dle Raie (38). Ostatní chromozomální aberace, věk, pohlaví, pozitivita CD38 či ZAP70 ani mutační stav IGHV s hladinou IgG souvislost neměly. Ishdorj et al. zjistili, že deficiency IgA a IgG jsou častější ve vyšších stádiích dle Raie a také u nemocných s IGHV subtypy 1-69, 3-21 a 3-49 (43). Abnormální hladiny IgA byly také spojeny s CD38 pozitivitou a zvýšeným $\beta 2$ mikroglobulinem, abnormální IgM s CD38 pozitivitou a s mutovanými IGHV geny. Chromozomální aberace v této studii vyšetřovány nebyly. Konečně Singh et al. pozorovali častější deficit u pacientů v pokročilých stádiích dle Raie a s vyšším počtem leukocytů (39). Ani zde nebyla případná souvislost s chromozomálními aberacemi zkoumána.

Při stanovení koncentrace imunoglobulinů nemocných je vhodné provést i elektroforézu sérových bílkovin a při detekci monoklonálního gradientu imunofixací k odhalení případného paraproteinu. Jeho výskyt samozřejmě zkresluje hodnocení koncentrace skutečně funkčních protilátek – hodnotu paraproteinu je nutno od celkové hodnoty Ig příslušné třídy odečíst. Přítomnost paraproteinu u nemocných s CLL je poměrně častá. V největší analýze dosud publikované na toto téma mělo z 1505 nemocných s dosud neléčenou CLL 10 % paraprotein IgG, 4,8 % paraprotein IgM, a pouze jeden pacient paraprotein IgA (50). Volné lehké řetězce byly v jiné studii detekovány až u 42 % nemocných, byť většinou v relativně nízké kvantitě (59). Paraprotein je často přítomen již ve stádiu monoklonální B-lymfocytózy (MBL) předcházející CLL – v práci Tsai et al. to bylo u 13 % pacientů (60). Abnormální poměr volných lehkých řetězců byl v této studii detekován dokonce u 38 % nemocných s MBL, a to až 9,8 let před diagnózou CLL. V případě paraproteinů IgG, IgM a volných lehkých řetězců byla popsána statisticky významná souvislost s kratším TTFT, OS a nepříznivými prognostickými ukazateli (nemutované IGHV, delecí 11q, 17p, vysokou koncentrací $\beta 2$ mikroglobulinu a řadou dalších) (50, 59, 61-63).

Pacienti s těžkou hypogamaglobulinémií a opakovanými bakteriálními infekcemi jsou indikováni k substituci imunoglobulinů (intravenózních – IVIG, subkutánních – SCIG nebo intramuskulárních) (19, 28, 29). Tento postup zřejmě vede ke snížení rizika infekčních komplikací, vliv na OS však prokázán nebyl, jak ukazují data z metaanalýzy devíti studií zahrnujících nemocné s CLL a mnohočetným myelomem (64). Nověji bylo publikováno prospektivní sledování vlivu substituce Ig na výskyt infekcí u 307 nemocných s CLL (42 % pacientů), indolentními lymfomy, mnohočetným myelomem a v menší míře s jinými příčinami sekundární hypogamaglobulinémie (65). Průměrná doba sledování jednoho nemocného byla 20,5 měsíce. Po zahájení substituce Ig klesla frekvence infekcí z 82 % během 1 roku před substitucí na 21 % v intervalu 6-12 měsíců po zahájení substituce. Při dalším sledování nicméně frekvence znovu stoupala. Ani zde nebyl prokázán vliv na OS.

4.2.2. Vliv léčby na koncentrace imunoglobulinů

CHIT je obecně považována za faktor zhoršující imunosupresi spojenou s CLL, a to včetně hypogamaglobulinémie. Z doby před nástupem anti-CD20 monoklonálních protilátek existuje na toto téma velmi málo dat. V analýze zahrnující tři různé studie používající fludarabin (71 pacientů), nebo fludarabin v kombinaci s prednisonem (103 pacientů) v první linii léčby CLL, měla po léčbě většina nemocných statisticky významný vzestup koncentrací IgG a IgM (66). Koncentrace IgA se po léčbě ve většině případů statisticky významně nezměnily, ale i zde byl vzestup častější než pokles. Popsané změny byly nezávislé na odpovědi na léčbu. Novější publikace většinou zahrnují data ze studií s použitím anti-CD20 monoklonálních protilátek. Keating et al. monitorovali koncentrace Ig ve studii s režimem FCR pro dosud neléčené nemocné s CLL (67). Šest měsíců po zahájení léčby nepozorovali statisticky významné změny v koncentracích žádné ze tříd Ig. Po 12 měsících od zahájení léčby statisticky významně poklesly (ve srovnání s měřením před léčbou) pouze IgG (všechna tři měření koncentrace IgG byla provedena u 105 pacientů). Opět nebyla shledána žádná souvislost s léčebnou odpovědí. Vzhledem k omezenému množství dat ohledně vlivu CHIT na koncentrace Ig specificky u CLL jsou dále uvedena i data ze studií s dalšími diagnózami. V retrospektivní analýze 211 nemocných s lymfomy (jen 38 z nich mělo CLL / lymfom z malých lymfocytů), léčených kombinací rituximabu a chemoterapie se podíl nemocných s nízkými IgG po léčbě zvýšil z 15 % na 48 % (68). V případě IgA to bylo z 11 % na 33 % a v případě IgM z 24 % na 52 %. Vyšší incidence hypogamaglobulinémie byla spojena s vyšší celkovou dávkou rituximabu a také

s fludarabinovými režimy, nikoliv však s některým typem lymfomu, věkem či pohlavím. V malé studii s nemocnými s indolentními lymfomy léčenými fludarabinem a rituximabem nedošlo po léčbě ke statisticky významné změně koncentrace IgG, IgA či IgM u 24 z 27 pacientů (69). Velká analýza efektu rituximabu na koncentrace IgG byla provedena u 243 nemocných s autoimunitními chorobami, zejména vaskulitidami (70). Více jak polovina z nich dostávala také perorální cyklofosfamid. Před podáním rituximabu mělo 26 % pacientů koncentraci IgG < 7 g/l, v průběhu sledování se tento podíl zvýšil až na 56 %. Nebyla nalezena souvislost mezi celkovou dávkou rituximabu a nadírem IgG. Celková dávka cyklofosfamidu byla asociována s nadírem IgG v období po podání rituximabu, ale nikoliv před ním. Údajů o efektu léčby obinutuzumabem nebo bendamustinem na koncentrace Ig je k dispozici ještě méně. Ve studii GALLIUM byl u nemocných s folikulárním lymfomem pozorován pokles ve všech třídách Ig bez ohledu na použitou protilátku nebo chemoterapeutický základ (bendamustin, nebo cyklofosfamid s doxorubicinem, vinkristinem a prednisonem) (71). Přesná data o míře poklesu ale nejsou k dispozici. Ve studii GAUDI byli nemocní s folikulárním lymfomem léčení obdobnými režimy chemoterapie, zde ale kombinovanými výhradně s obinutuzumabem (72). Mediány koncentrací všech tříd Ig po indukční fázi léčby poklesly, ale zároveň zůstaly v normálním rozmezí a během udržovací léčby obinutuzumabem nedocházelo k dalšímu poklesu. Informace o případném rozdílu vlivu obou chemoterapeutických režimů nebyly publikovány. Lze shrnout, že kromě uvedených Keatingových prací nemáme k dispozici žádné studie o změnách koncentrací Ig vlivem CHIT u velkých kohort nemocných s CLL.

Na rozdíl od CHIT byl po léčbě ibrutinibem popsán vzestup koncentrací Ig, konkrétně IgA (73-77). V některých studiích měli také pacienti se vzestupem IgA po léčbě ibrutinibem méně infekčních komplikací (75, 77). V randomizované studii srovnávající monoterapii ibrutinibem s kombinací ibrutinib + rituximab byl vzestup IgA pozorován v obou ramenech (78). V obou ramenech ale došlo také k poklesu koncentrací IgG a v kombinačním rameni i IgM. V ostatních citovaných studiích se koncentrace IgG a IgM po léčbě ibrutinibem významně nezměnily, kromě práce Cassin et al., kde také pozorovali pokles koncentrace IgG (77). Málo dat je zatím k dispozici o BTKi druhé generace. Akalabrutinib vedl u nemocných s CLL ve dvou studiích fáze 1/2 (v jedné šlo o léčbu první linie, v druhé o relabovanou / refrakterní CLL) ke statisticky významnému vzestupu IgA, zatímco koncentrace IgG a IgM se významněji nezměnily (79, 80). Data o koncentracích Ig z velkých studií fáze 3 s akalabrutinibem zatím publikována nebyla a

stejně tak nejsou v tomto směru žádné informace o účincích zanubrutinibu (25, 81). Další preparáty cílené léčby u CLL (idelalisib, venetoklax) nemají zřejmě na koncentrace imunoglobulinů výrazný vliv (82-84).

4.3. Poruchy specifické buněčné imunity

Buněčnou část specifické imunity reprezentují T-ly, které podléhají u nemocných s CLL celé řadě změn – mění se jejich absolutní počty i relativní zastoupení jednotlivých subsetů a zároveň dochází k funkčním změnám. Celkový počet T-ly se zvyšuje. Ve studii Palmer et al. mělo zvýšený celkový počet T-ly ($> 2 \times 10^9/l$) 54% nemocných, ve studii Gonzalez-Rodriguez et al. 51% nemocných (zde byla horní mez normy $1.787 \times 10^9/l$) (85, 86). Zvýšení počtu T-ly jde zejména na vrub $CD8^+$ buněk, což vede k obrácení fyziologického poměru mezi $CD4^+$ a $CD8^+$ lymfocyty (86, 87). Absolutní počet $CD4^+$ lymfocytů se ve srovnání se zdravými jedinci také zvyšuje, ale ne tak výrazně jako v případě $CD8^+$. Původně byl zvýšený počet T-ly u nemocných s CLL přikládán cytomegalovirové (CMV) infekci (88). Později ale byly změny v populacích T-ly popsány i u nemocných bez CMV séropozitivity (87, 89).

Fyziologicky prochází $CD4^+$ a $CD8^+$ T-ly vývojem od naivních buněk (charakterizovaných expresí CCR7, CD45RA a negativitou CD45RO), přes centrální paměťové T-ly (TCM; CCR7⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁻), které se dále diferencují v efektorové paměťové T-ly (TEM; CCR7⁻, CD45RO⁺, CD45RA⁻) a nakonec v terminálně diferencované efektorové T-ly (TEMRA; CCR7⁻, CD45RO⁻, CD45RA⁺) (90, 91). Ve studii, která se zastoupením jednotlivých buněčných populací u nemocných s neléčenou CLL zabývala, měli pacienti s inverzí poměru $CD4^+$ a $CD8^+$ v rámci $CD4^+$ subsetu vyšší podíl TEM a TEMRA lymfocytů na úkor naivních, a v rámci $CD8^+$ subsetu vyšší podíl TEMRA lymfocytů na úkor naivních T-ly a TCM (87). U nemocných bez inverze poměru $CD4^+$ a $CD8^+$ byl patrný pouze vzestup TEMRA v rámci $CD4^+$ a pokles naivních T-ly v rámci $CD8^+$ buněk. Pacienti se změnou poměru $CD4^+$ a $CD8^+$ T-ly měli v uvedené studii kratší PFS, TTFT i zdvojovací čas lymfocytů. Naopak nebyla pozorována asociace s vyšší expresí CD38, ZAP70, mutačním stavem IGHV nebo stadiem CLL v době diagnózy. Wu et al. také pozorovali vztah inverze poměru $CD4^+$ a $CD8^+$ s kratším TTFT a navíc i stadiem dle Bineta a kratším OS (92). V další práci byla popsána souvislost expanze $CD4^+$ TEM a $CD8^+$ TEMRA subsetů T-ly s prognosticky nepříznivými chromozomálními aberacemi (delece 11q, nebo 17p), nemutovanými IGHV, potřebou léčby a stadiem onemocnění dle Bineta (93). Kratší OS bylo popsáno i u nemocných s nižším poměrem $CD4^+$, respektive $CD8^+$ T-ly k počtu CLL buněk,

zatímco samotné absolutní počty CLL buněk, CD4⁺ nebo CD8⁺ T-ly vliv na OS v této studii neměly (86). Konečně ve studii Gonnorda et al. měli pacienti progredující k léčbě do 6 měsíců od vyšetření a dále také ti s nemutovanými IGHV geny a stadiem Binet B / C větší zastoupení TEM a naopak méně TCM v rámci CD8⁺ T-ly (94).

Zásadní roli v patogenezi CLL hrají mimo jiné také regulační T-ly (T-reg). Ty za fyziologických podmínek brání nadměrnému poškození vlastních tkání v průběhu zánětu a rozvoji autoimunitních chorob. T-reg jsou mimo jiné schopné zabíjet efektorové CD4⁺ a CD8⁺ T-ly granzymem a perforinem a produkují supresivní cytokiny interleukin (IL) 10 a transforming growth factor β (TGF- β), kterými potlačují nejen ostatní T-ly, ale např. také dendritické buňky (95). T-reg jsou na úrovni fenotypu definovány expresí CD4 a FOXP3, vysokou expresí CD25 a naopak nízkou expresí CD127. Dále je definována řada subsetů (CD39⁺ T-reg, CD8⁺ T-reg, nebo T-reg s nízkou expresí CD25), jejichž zastoupení u CLL a zdravých jedinců se může lišit (96, 97). U CLL byl opakovaně popsán zvýšený absolutní počet T-reg ve srovnání se zdravými kontrolami i zvýšený relativní počet v poměru k ostatním T-ly a to zejména u pokročilejších stádií choroby, nebo u nemocných indikovaných k léčbě (96-100). V jedné ze studií byl počet T-reg v multivariantské analýze nezávislým nepříznivým rizikovým faktorem stran progresu k léčbě (101). Bylo pozorováno, že T-reg zdravých jedinců jsou schopny indukovat apoptózu CLL buněk, zatímco T-reg pacientů s CLL nikoliv (97). Další funkce včetně suprese efektorových T-ly se nicméně u T-reg kontrol i nemocných ve studiích nelišily (95, 97, 100). Specifickým subsetem T-ly jsou NKT buňky – T-ly s vlastnostmi NK buněk (NK – natural killer, přirození zabíječi). Mají rysy přirozené i adaptivní imunity, schopnost lýt cílové buňky i regulační funkce, tedy schopnost produkce cytokinů. U nemocných s progredující CLL indikovanou k léčbě byl ve srovnání s nemocnými bez známek aktivity choroby a se zdravými kontrolami pozorován snížený počet NKT buněk (102).

Pomocné CD4⁺ T-ly se po kontaktu s antigenem prostřednictvím antigen prezentujících buněk (antigen presenting cell, APC) diferencují do několika možných subtypů s odlišnými efektorovými funkcemi – tradičně Th1 a Th2, nověji např. Th3, Th9, Th17 a dalších. S progresí choroby dochází k přesunu těžiště imunitní odpovědi z Th1 k Th2 typu. U MBL, která je předstupněm CLL, převažuje Th1 imunitní odpověď s vyšší koncentrací cytokinů IL-8, interferon γ (IFN γ) a tumor necrosis factor α (TNF α) (103). U rozvinuté CLL je popisována převaha Th2 imunitní odpovědi, která se odráží ve zvýšení koncentrací nebo nitrobuňčné

exprese IL-5 a IL-10 a naopak snížení IFN γ (104). U řady dalších cytokinů nejsou data jednoznačná a jednotlivé studie přináší protichůdné výsledky, přibývá však důkazů o klíčovém významu IL-4. U nemocných s CLL byly ve srovnání se zdravými kontrolami popsány vyšší koncentrace IL-4 a byl také prokázán jeho vliv na zvýšení exprese povrchového IgM a CD79b, tedy částí B-buněčného receptorového komplexu (105-108). To vede ke zvýšení signalizace přes B-buněčný receptor, která je důležitá pro přežívání CLL buněk. Další studie popisují protektivní vliv subsetu Th17 u nemocných s CLL (96, 109). Th17 buňky působí prozánětlivě a za fyziologických podmínek hrají roli protichůdnou regulačním T-ly, mohou také hrát roli v patogenezi některých autoimunitních onemocnění. Pokles Th17 subsetu byl ve studii Hus et al. asociován s CD38 a ZAP70 pozitivitou a refrakterností na léčbu fludarabinovými režimy (109). Nízká koncentrace IL-17 byla navíc spojena s kratším TTFT, del 11q a del 17p. Zastoupení Th17 buněk zároveň inverzně korelovalo s počtem T-reg a koncentrace IL-17 zase s koncentrací IL-10.

U T-ly nemocných s CLL je popisován tzv. stav pseudovyčerpání. Ten je charakteristický sníženou proliferací, poruchou schopnosti vytvořit imunologickou synapsi s APC nebo s cílovými patologickými buňkami a poruchou tvorby a intracelulární distribuce granzymových vesikul, která by umožnila cílenou degranulaci v místě synapse (89). Tento stav je důsledkem interakce mezi molekulami PD-1 (programmed death 1 = CD279), CD200R a CD272 na T-ly a jejich ligandy PD-L1 (programmed death ligand 1 = CD274), CD200, CD270 a CD276 na CLL buňkách (110). Tyto molekuly jsou na T-ly pacientů a CLL buňkách exprimovány výrazně více, než na T-ly a B-ly zdravých jedinců, a to již ve stádiu MBL (93, 103, 110). Vyšší exprese PD-1 byla pozorována na T-ly pacientů s progredující CLL indikovanou k léčbě ve srovnání s T-ly nemocných bez známek aktivity choroby (111).

U CLL tedy nacházíme snížení počtu naivních a paměťových buněk a zároveň expanzi efektorových T-ly (jak bylo popsáno výše), které jsou však "vyčerpané." Důsledkem těchto změn může být horší schopnost imunitní odpovědi na nové podněty (ať již infekční, nebo nádorové) (87,89). Monoklonální protilátky proti PD-1 molekule nivolumab a pembrolizumab nemají u CLL na rozdíl od Hodgkinova lymfomu výraznější efekt (112, 113). Možným vysvětlením je ve srovnání s Hodgkinovým lymfomem nižší exprese PD-1 na T-ly u nemocných s CLL, potenciální vliv dalších inhibičních molekul (CD160, CD200R, CD244, CD272) a také

celková alterace imunitního systému u CLL, kdy obnovení funkce T-ly nemusí samo o sobě stačit k dostatečné imunitní odpovědi proti malignímu klonu (89, 113).

U CLL byla popsána ještě celá řada dalších odchylek T-ly od fyziologického stavu. Např. zvýšená exprese CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, CD152) molekuly, která kompetuje s CD28 na T-ly o vazbu na CD80/86 na APC a inhibuje tak aktivaci T-ly (114). Dále např. snížená exprese CD11a (adhezivní a kostimulační molekula), CD25 (receptor pro IL-2), CD28, CD154 (molekula na pomocných T-ly, která interakcí s CD40 na B-ly, monocytech a dendritických buňkách přispívá k jejich aktivaci), nebo CD1d (molekula podobná HLA I. třídy umožňující prezentaci antigenů specifickému subsetu T-ly) (115-117). CD4, CD8 i CD3 molekuly jsou na T-ly exprimovány méně než je běžné u zdravých jedinců (115, 118). Některé molekuly s inhibiční funkcí jsou naopak exprimovány zvýšeně, jak již bylo diskutováno (CD160, CD200R, CD244, CD272), stejně jako některé markery aktivace jako HLA-DR, nebo CD69 (30, 115).

Příčinou popsaných změn postihujících T-ly jsou zejména CLL buňky, které získávají některé schopnosti regulačních B-ly (119). Ty jsou za normálních okolností zcela minoritní populací B-ly, která přímým kontaktem nebo prostřednictvím cytokinů IL-10 a TGF- β potlačuje proliferaci Th1, Th2 i Th17 lymfocytů, NK buněk, dendritických buněk i makrofágů, a naopak stimuluje diferenciaci a proliferaci T-reg. CLL buňky dále zvýšeně exprimují molekulu HLA-G, která působí inhibičně na cytotoxické T-ly a NK buňky a secernují solubilní receptor pro IL-2, čímž snižují koncentraci IL-2 a aktivaci T-ly (120-122). T-ly pak zpětně interakcí mezi CD40L (CD154) na T-ly a CD40 na CLL buňkách přispívají k aktivaci CLL buněk, zvyšují jejich expresi CD38 a ZAP70 i rychlost jejich proliferace a odolnost vůči apoptóze (30).

Defekty buněčné imunity teoreticky predisponují k infekcím oportunními patogeny, jako jsou listerie, nocardie, kandidy, aspergily, Pneumocystis jiroveci, Mycobacterium tuberculosis nebo atypická mykobakteria a dále k infekcím zejména herpetickými viry. K rozvoji těchto komplikací je však obvykle nutný ještě imunopresivní efekt protileukemické léčby, takže i přes popsané defekty specifické buněčné imunity trpí neléčení nemocní zejména infekcemi popsanými v části o hypogamaglobulinémii, zatímco oportunní infekce jsou u nich vzácné (30). Klinický význam změn buněčné imunity u neléčených pacientů tak spočívá spíše v neschopnosti imunitního systému účinně zasáhnout proti CLL samotné.

4.3.1. Vliv léčby na populace T-lymfocytů

Režimy CHIT kombinující monoklonální protilátky, alkylační cytostatika a purinová analoga vedou k hluboké imunosupresi a vysoké frekvenci oportunních infekcí včetně diseminovaných herpetických infekcí, invazivních mykóz a pneumocystových pneumonií, přičemž zásadní je v tomto směru role fludarabinu (123, 124). Po podání FCR byla pozorována hluboká deplece CD4⁺ a v menší míře i CD8⁺ a NK buněk (125-127). Zajímavé je, že deplece CD4⁺ korelovala v těchto studiích s negativitou minimální /měřitelné reziduální choroby (minimal / measurable residual disease, MRD) a příznivou prognózou. Samotný fludarabin vede také k depleci T-reg, což může vést k lepší kontrole onemocnění imunitním systémem a přispívat k protinádorovému účinku této léčby (128). Vlivem FCR, zejména fludarabinu se mění i zastoupení funkčních subsetů T-ly – dochází k depleci naivních T-ly a zvýšení podílu paměťových buněk (127, 129). Alkylační cytostatikum cyklofosfamid vykazuje mimo jiné podobné lymfodepleční účinky jako fludarabin včetně změny poměru mezi CD4⁺ a CD8⁺ buňkami (130). Stejně jako fludarabin vede také k redukci počtu T-reg, přičemž tento účinek je závislý na dávkovacím schématu (131). Do jaké míry je vyjádřen v dávkování používaném při FCR však není známo.

Dat ohledně poklesu lymfocytů po léčbě BR je k dispozici poměrně hodně, avšak většina prací se netýká specificky CLL, ale pacientů s indolentními lymfomy (71, 132-136). Tyto studie ukazují, že obnova počtu T-ly po bendamustinu může být ještě pomalejší, než po fludarabinu – počty CD4⁺ buněk klesají až pod $0,2 \times 10^9/l$ a zůstávají takto nízké až 2 roky po zahájení léčby. CD8⁺ a NK buňky jsou ovlivněny méně a obnovují se rychleji. Data o změnách funkčních subsetů (naivních T-ly, TCM, TEM, TEMRA), nebo T-reg po léčbě BR zatím prakticky chybí. Pouze dvě studie byly publikovány na téma změn počtu T-ly po chlorambucilu a ukazují, že i toto cytostatikum může vést k depleci CD4⁺ buněk i dalších populací (137, 138).

BTK inhibitory zlepšují vedle humorální i některé parametry buněčné imunity. Ibrutinib snižuje expresi PD-L1 na CLL buňkách a PD-1 na T-ly i produkci IL-10 CLL buňkami (138, 139). Dále inhibuje enzym IL-2 indukibilní kinázu. Tato je součástí nitrobuněčné signalizace přes T-buněčný receptor a hraje klíčovou roli pro funkci Th2 buněk. Inhibice IL-2 indukibilní kinázy tedy vede k posunu směrem k Th1 imunitní odpovědi a antagonizuje posun k Th2, který je způsoben CLL. Tímto způsobem ibrutinib může přispívat ke zlepšení imunity proti některým intracelulárním patogenům, jednak dále potlačovat proliferaci CLL buněk, které z

převahy Th2 imunitní odpovědi profitují (140, 141). Data o změnách počtů buněčných populací při léčbě ibrutinibem jsou zatím poněkud rozporuplná. Long et al. pozorovali zvýšení počtu CD4⁺ a CD8⁺ buněk (142). Podobně jako působením samotné CLL bylo sice toto zvýšení hlavně důsledkem zvýšení TEM a TEMRA T-ly, na rozdíl od CLL ale nikoliv na úkor naivních T-ly a TCM, jejichž počet stoupal také, i když méně. Absolutní počet T-reg se významněji neměnil, ale vzhledem k vzestupu ostatních CD4⁺ klesalo jejich procentuální zastoupení. Ve studii RESONATE-2 vedla léčba ibrutinibem k poklesu počtu celkových T-ly i většiny subpopulací, včetně T-reg a NKT buněk, ale byly zachovány naivní T-ly a NK buňky (138). Diskrepance může být dána rozdílným časem měření od zahájení léčby, kdy Long et al. prováděli většinu měření ještě v době lymfocytózy na jejím začátku (ve 3 a 6 měsících), zatímco v RESONATE-2 byly prováděny měření i v 9 a 12 měsících. Je pravděpodobné, že s delším sledováním by se výsledky Longa et al. blížily těm ze studie RESONATE-2. Podrobné funkční posouzení T-ly po léčbě ibrutinibem bylo publikováno ve stejné práci, tentokrát ale na souboru nemocných ze studie RESONATE. Ibrutinib obnovil schopnost proliferace T-ly, sekrece cytokinů (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, and TNF- α), degranulace (sekrece granzymu A a B, granulysin a perforinu) a snížil apoptózu i neapoptotickou smrt T-ly po aktivaci (138).

BTK inhibitor 2. generace akalabrutinib podobně jako ibrutinib snižuje expresi PD-1 a dalších inhibičních molekul na T-ly i produkci IL-10 CLL buňkami (142). Nemá však vliv na IL-2 inducibilní kinázu, takže nevede k posunu k Th1 imunitní odpovědi a také nechrání T-ly před aktivací indukovanou neapoptotickou smrtí (142). Stejně tak akalabrutinib nemění významně počty T-ly ani NK buněk (142, 143).

Idelalisib nepůsobí významné změny v celkových počtech CD4⁺ a CD8⁺ buněk, ale snižuje počet a aktivitu T-reg, což na jednu stranu antagonizuje působení CLL a reaktivuje protinádorovou imunitu, na druhou stranu je to ale také příčina množství autoimunitních komplikací při léčbě idelalisibem (autoimunitní kolitida, hepatitida, pneumonitida) (144-148). In vitro byl pozorován vliv na produkci cytokinů T lymfocyty (snížení produkce IL-4, IL-6, IL-10 a TNF α) a NK buňkami (snížení produkce IFN γ). Tyto změny v podstatě odpovídají již popisovanému posunu imunitní odpovědi od Th2 k Th1 a mohou být dalším mechanismem účinku idelalisibu (149, 150). Byl také prokázán pokles exprese PD-1 na T-ly (150). Zároveň ale idelalisib in vitro snižoval cytotoxicitu a sekreci granzymu T-ly a proliferaci a cytotoxicitu NK buněk, a to jak u buněk pacientů s CLL tak i u buněk zdravých dárců (150). To je zřejmě příčinou vysokého

výskytu infekcí včetně oportunních (pneumocystové pneumonie, CMV infekce) při léčbě idelalisibem (151-153).

Venetoklax inhibuje antiapoptotický protein bcl-2. Ten je však široce exprimován v řadě tkání včetně většiny leukocytů, takže při léčbě dochází také k poklesu CD4⁺, CD8⁺, NK buněk a neutrofilů. Byl popsán i pokles T-reg a pokles exprese PD-1 na T-ly, zde se však může jednat o nepřímý vliv venetoklaxu prostřednictvím potlačení aktivity CLL (83).

4.4. Poruchy nespecifické imunity

Stručně je nutno popsat i defekty nespecifické (přirozené) imunity, i když s výjimkou NK buněk nejsou v experimentální části práce zkoumány. Některé morfologické abnormality, jako např. deficit azurofilních granulí a také snížení cytolytické aktivity byly u NK buněk pacientů s CLL popsány již v 80. letech (154). Zásadní jsou však změny exprese aktivačních a inhibičních receptorů na NK buňkách a také změny exprese ligandů těchto receptorů na CLL buňkách, které se v tomto směru liší od fyziologických B-ly. U NK buněk nemocných byla popsána snížená exprese aktivačních receptorů NKG2D, DNAM-1, NKp46 a NKp30 a naopak zvýšená exprese inhibičních receptorů ILT-2 (LIR1) nebo Tim-3 (155-160). Exprese hlavního inhibičního receptoru NK buněk NKG2A se u nemocných s CLL neliší od zdravých kontrol, CLL buňky však zvýšeně exprimují ligandy pro tyto receptory, např. HLA-E (157, 161). Tyto změny umožňují CLL buňkám unikat imunitnímu dozoru NK buněk, je ale nutno upozornit, že některé vycházejí v různých studiích různě a jejich význam je tedy sporný (exprese NKp30, HLA-E). Zvláštní místo mezi receptory NK buněk zaujímá CD16, tedy receptor pro Fc fragment protilátek. Je to jediný receptor svého typu na NK buňkách a jeho prostřednictvím je realizována na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita, včetně té zprostředkované terapeutickými monoklonálními protilátkami, jako jsou rituximab nebo obinutuzumab. I v případě CD16 byla na NK buňkách pacientů s CLL popsána abnormálně nízká exprese ve srovnání se zdravými kontrolami (156). Ani zde ale nejsou výsledky konzistentní a v jiných studiích nízká exprese CD16 zjištěna nebyla (157, 162). Minimálně v časných stádiích CLL je popisován zvýšený celkový počet NK buněk (155, 158). Toto zvýšení počtu jde však zejména na vrub nezralých a funkčně nekompetentních NK buněk, zatímco subset zralých NK buněk s cytolytickou aktivitou je potlačen (163). Přesto Wang et al. popsali souvislost nižšího počtu NK buněk s kratším OS a vyšším výskytem nepříznivých prognostických znaků (mutace *TP53*, nemutované IGHV, vyšší $\beta 2$ mikroglobulin,

vyšší exprese CD38 a další) (164). Byl také popsán kratší TTFT u nemocných s nižším poměrem NK buněk ke klonálním B-ly (85).

S neutropenií bez vztahu k léčbě se lze setkat u nemocných v pokročilých stádiích CLL s masivní infiltrací kostní dřeně. Naopak vyšší absolutní počet neutrofilů ($> 7 \times 10^9/l$) před léčbou byl ve studii Levy et al. spojen s delším TTFT i OS (165). Funkční defekty neutrofilů popsali Itälä et al. (defekty náhodné i cílené migrace a respiračního vzplanutí), Zeya et al. (deficit lysozymu a myeloperoxidázy) a Manukyan et al. (porucha produkce IL-1 β a TNF α po stimulaci lipopolysacharidy) (166-168). V další studii měli neutrofilové pacientů s CLL sníženou efektivitu zabíjení bakteriálních (*Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*), ale překvapivě nikoliv houbových (*Candida albicans* a *Aspergillus fumigatus*) patogenů (169). Změnu vlastností neutrofilů způsobují IL-10, TGF- β a růstové faktory produkované CLL buňkami (170). Takto ovlivněné neutrofilové abnormálně dlouho přežívají, potlačují aktivaci T-ly a jsou označovány jako tzv. s tumorem asociované neutrofilové.

U nemocných s CLL byl ve srovnání se zdravými kontrolami pozorován zvýšený celkový počet monocytů a změny v zastoupení jejich subpopulací (171). Vyšší absolutní počet monocytů v době diagnózy je přitom spojen s kratším OS i TTFT (172). U monocytů byly dále popsány poruchy metabolismu glukózy a fagocytózy (173). Tyto defekty spouštěla mimo jiné interakce PD-1 na monocytech s PD-1L na CLL buňkách, přičemž PD-1 byl na monocytech ve srovnání se zdravými kontrolami exprimován zvýšeně. Specifickou subpopulací monocytů jsou tzv. monocytární "myeloid-derived suppressor cells" (MDSC), charakteristické nízkou expresí HLA-DR (174). Monocytární MDSC produkují IL-10, TGF- β , reaktivní formy kyslíku a enzymy indolamin-2,3-dioxygenázu a arginázu, které působí depleci tryptofanu a argininu důležitého pro T-ly (174, 175). Potlačují produkci IFN- γ , proliferaci T-ly a naopak podporují diferenciaci a proliferaci T-reg (175, 176). V krvi pacientů s CLL jsou monocytární MDSC ve srovnání se zdravými kontrolami signifikantně zvýšeny, což je spojeno s vyšší aktivitou choroby, kratším PFS i OS nemocných (174-177).

Důležitou roli v patogenezi CLL hrají tzv. nurse-like buňky (nurse-like cells, NLC). Jde o specifickou formu makrofágů se schopností produkce celé řady cytokinů, např. IL-10, TGF- β , BAFF (B-cell activating factor), APRIL (A proliferation-inducing ligand), CXCL12 (chemokine [C-X-C motif] ligand 12), CXCL 13, CCL4 (chemokine [C-C motif] ligand 4), CCL18 a dalších (178-180). Tyto cytokiny působí imunosupresivně, atrahují CLL buňky a podporují jejich přežívání.

Důsledkem jejich působení je také potlačení proliferace T-ly, kromě T-reg, jejichž množství se naopak zvyšuje (178, 179). NLC exprimují také PD-L1 a podílí se tak na popsaném stavu pseudovyčerpání T-ly (93, 179). Míra infiltrace lymfatických uzlin NLC koreluje s pokročilostí CLL (181).

Poslední buněčnou populací nespecifické imunity jsou dendritické buňky, které mají u nemocných s CLL také řadu defektů. Uvádí se snížená exprese HLA-DR, kostimulačních molekul (CD80, CD86, CD83, a CD40) a snížená produkce cytokinů (IL-12, TNF, IL-6, IL-10) (182).

U nemocných s CLL byly popsány také defekty humorální složky nespecifické imunity, tedy komplementu. Deficit alespoň jedné z jeho složek mělo ve studii Schlesingera et al. 40% pacientů ve stádiích Rai 0-I a všichni nemocní ve stádiu Rai II-IV (183). V další studii měli pacienti s nižší aktivitou klasické cesty aktivace komplementu a také s nižšími koncentracemi složek C3 a C4 kratší OS (184). Koncentrace C4 jsou nicméně u pacientů s CLL srovnatelné se zdravými jedinci a koncentrace C3 jsou dokonce u nemocných vyšší (185). Hlavní příčinou snížené aktivity klasické cesty aktivace je tedy zřejmě především nižší aktivita C5 konvertázy a nižší koncentrace složky C2. Deficit jednotlivých složek je pravděpodobně důsledkem chronické aktivace komplementu, přičemž tím, co tuto aktivaci u nemocných spouští, jsou agregáty molekul IgG (konkrétně hexamery) a α_2 makroglobulinu (186-187). Komplement hraje roli především při obraně organismu před opouzdřenými bakteriemi, ale poruchy jeho funkce mohou také přispívat k progresi CLL samotné a k rozvoji autoimunitních komplikací, jako jsou autoimunitní hemolytická anémie a imunitní trombocytopenie (188). Oponizace apoptotických buněk komplementem a jejich následná fagocytóza makrofágy je totiž nezbytná k produkci protizánětlivých cytokinů. Naopak nahromadění apoptotických buněk a uvolnění antigenů z nich stimuluje potenciální autoimunitní reakci. Oponizace apoptotických buněk je také zásadní při negativní selekci autoreaktivních B-ly během jejich vývoje v kostní dřeni. Pokud nejsou autoreaktivní B-ly v dostatečném kontaktu s opsonizovanými autoantigeny, nejsou "odhaleny" jako autoreaktivní a je umožněna jejich maturace. Dalším důsledkem akumulace apoptotických buněk je chronická stimulace B-buněčného receptoru antigeny, které se z těchto buněk uvolňují, což může podporovat progresi CLL.

4.4.1. Vliv léčby na nespecifickou imunitu

Deplece NK buněk po režimech CIT je o něco menší než u CD4⁺ a obdobná jako u CD8⁺ buněk a byla již zmíněna výše (125-127, 132, 135-138). Neutropenie je pak očekávaným důsledkem cytostatické léčby přirozeně spojeným s vyšším výskytem infekčních komplikací (55). S neutropenií se však setkáváme i po léčbě anti-CD20 monoklonálními protilátkami a to typicky s odstupem – jedná se o tzv. pozdní neutropenii (189). Je definována jako pokles počtu neutrofilů v periferní krvi pod $1,5 \times 10^9/l$ nejméně 4 týdny po podání rituximabu (tedy v době, kdy už je obvykle kostní dřevň po chemoterapii zregenerována). Vyskytuje se u 5,6-27,3 % nemocných a obvykle nebývá provázena infekčními komplikacemi. Medián doby od podání léčby do záchytu neutropenie je 56-175 dnů a medián trvání 6-77 dnů. Jako možné vysvětlení se uvádí deficit růstových faktorů, které jsou spotřebovány při obnově populace rituximabem depletovaných B-ly. Méně pravděpodobný se jeví autoimunitní mechanismus vzniku (ať už na bázi autoprotiátok či buněčné imunity proti prekurzorům neutrofilů).

Pokles počtu monocytů byl popsán po režimech FCR, BR i chlorambucilu (125, 136, 138). Na rozdíl od počtu monocytů před léčbou nebyl prokázán prognostický význam jejich poklesu po léčbě (125). Vliv CIT na další složky buněčné nespecifické imunity zůstává z větší části nepopsán. Pouze v případě bendamustinu byl po léčbě pozorován pokles plazmocytoidních a naopak vzestup klasických dendritických buněk (190).

Lépe je popsán vliv léčby, konkrétně anti-CD20 monoklonálních protilátek na aktivitu komplementu. Na komplementu závislá cytotoxicita je totiž jedním z hlavních mechanismů jejich účinku zejména v případě rituximabu (méně už u obinutuzumabu). Defekty komplementu mohou mít dopad na účinnost této léčby, která zároveň spotřebovává jeho složky. Pokles aktivity komplementu po anti-CD20 léčbě je u CLL mnohem hlubší, než u zdravé populace (191). Lze však zvrátit přidáním plazmy, nebo jednotlivých složek komplementu, přičemž jako nejvíce limitující se jeví koncentrace složky C2. Bylo také prokázáno, že pacienti s in vitro rezistencí CLL buněk ke komplementu mají při anti-CD20 léčbě kratší čas do relapsu (45 vs. > 80 měsíců, $p = 0,03$) a méně často dosahují kompletní remise (65,2% vs. 100%, $p = 0,03$) (192).

Změny nespecifické imunity vlivem cílené léčby jsou prozkoumány podrobněji než v případě CIT. Zatímco ibrutinib ani akalabrutinib nezpůsobují významný pokles NK buněk, inhibice bcl-2 proteinu venetoklaxem jejich počet snížit může (83, 138, 142, 143). NK buňky jsou také citlivé

na inhibici IL-2 inducibilní kinázy ibrutinibem a fosfatidylinositol-3kinázy idelalisibem (150, 193). Důsledkem je inhibice degranulace, cytotoxicity a produkce IFN γ . Dysfunkce NK buněk tak vede k poklesu na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity – jednoho z hlavních mechanismů účinku anti-CD20 protilátek, zejména obinutuzumabu (194, 195). Akalabrutinib ani zanubrutinib IL-2 inducibilní kinázu neinhibují a s anti-CD20 léčbou tak nijak neinterferují (193, 195). Zlepšení degranulace a produkce IFN γ NK buňkami bylo popsáno po léčbě kombinující venetoklax s obinutuzumabem, ale nikoliv s ibrutinibem (83).

Neutropenie je běžným nežádoucím účinkem při léčbě ibrutinibem, zatímco po akalabrutinibu se popisuje zvýšení počtu neutrofilů, i když mechanismus je spíše nepřímý, tedy potlačení vlivu CLL (143, 193). Ibrutinib také (na rozdíl od akalabrutinibu) zhoršuje řadu neutrofilních funkcí od aktivace, přes produkci cytokinů včetně např. IL-8 a TNF α až po schopnost degranulace, fagocytózy, respiračního vzplanutí a nitrobuněčného zabíjení bakterií (193). To spolu s níže uvedeným zhoršením funkce makrofágů zvyšuje riziko infekcí, včetně invazivních mykóz (196). Data týkající se idelalisibu jsou rozporuplná a byly publikovány práce prokazující i vyvracející dysfunkci neutrofilů v důsledku inhibice fosfatidylinositol-3kinázy (150, 197). Venetoklax vede opět mechanismem inhibice bcl-2 k poměrně častým neutropeniím, ale neovlivňuje zřejmě funkce neutrofilů a léčba tak není provázena častými infekcemi (83, 198).

V případě počtu monocytů se na rozdíl od neutrofilů popisuje příznivý vliv ibrutinibu (zvýšení počtu), zatímco akalabrutinib tento účinek nemá (138, 143). Ibrutinib naopak snižuje počet imunosupresivních MDSC (199). Zároveň ale ibrutinib podporuje diferenciaci monocytů směrem k M2 makrofágům s imunosupresivními účinky, mezi které patří i výše popsané NLC (200). Jak ibrutinib, tak akalabrutinib také působí poruchu aktivace, produkce prozánětlivých cytokinů a fagocytózy u monocytů/makrofágů (193). To může opět vést ke zvýšenému riziku infekcí. Porucha na protilátkách závislé fagocytózy může omezit účinnost léčebně užívaných monoklonálních protilátek, což bylo pozorováno u ibrutinibu, ale nikoliv u akalabrutinibu (193). V případě idelalisibu jsou opět k dispozici studie prokazující i vyvracející vliv na fagocytózu makrofágy (150, 194). Práce věnující se vlivu venetoklaxu na funkce monocytů/makrofágů zatím chybí.

Ibrutinib vede u nemocných s CLL k mírnému zvýšení počtu plazmocytoidních dendritických buněk, jejichž hlavní funkcí je především antivirová imunita (193). Dále ovlivňuje expresi celé

řady povrchových molekul a produkci cytokinů dendritickými buňkami, a to navíc různě v závislosti na fázi jejich diferenciaci. Klinický dopad této imunomodulace je zatím nejasný.

Idelalisib u dendritických buněk snižuje produkci cytokinů (IL-12, IL-13, TNF α) a omezuje jejich schopnost coby APC aktivovat T-ly, což se může podílet na vysokém výskytu oportunních infekcí při léčbě (201). Data týkající se vlivu akalabrutinibu, nebo venetoklaxu na dendritické buňky nebyla dosud publikována, ačkoliv lze očekávat, že BTK inhibice akalabrutinibem na ně bude mít stejné účinky jako v případě ibrutinibu.

5. Cíle disertační práce

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

6. Metody a soubor nemocných

Jednalo se o prospektivní unicentrickou observační studii. Zařazování byli pacienti s CLL diagnostikovanou dle IWCLL (International Workshop on CLL) kritérií z roku 2008, sledování a případně léčení na IV. interní hematologické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové od září 2013 do listopadu 2020 (202). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii, studie byla schválena místní etickou komisí a probíhala v souladu s Helsinskou deklarací. Nemocným byly odebírány vzorky periferní krve při vstupu do studie (bez ohledu na to, zda u nich byla choroba diagnostikována recentně, nebo již v minulosti). Jednalo se pouze o dosud neléčené pacienty. V případě, že šlo o nemocné bez indikace k léčbě (s neaktivní, stabilní chorobou), u nichž však časem došlo k progresi onemocnění a léčba byla indikována, byl před zvažovanou léčbou proveden 2. odběr. Část pacientů byla k léčbě indikována již v okamžiku vstupu do studie a 1. odběr krve byl tedy zároveň odběr před léčbou. Všechny odběry před léčbou byly provedeny méně než 2 měsíce před zahájením léčby (obvykle jen několik dnů). U části nemocných byl proveden 2. odběr po ukončení léčby, (respektive již 3. odběr, pokud předtím měli odběr ve stádiu neaktivní choroby). Tento odběr byl prováděn v době hodnocení léčebné odpovědi, v rozmezí 1-3 měsíce po posledním cyklu léčby (obvykle přibližně 2 měsíce). Léčba byla indikována na základě IWCLL 2008 kritérií, které odpovídají v úvodu citovaným Českým doporučením pro diagnostiku a léčbu CLL (příloha 11.2.) (19). Po léčbě byla analyzována pouze data nemocných léčených CHIT, a to konkrétně režimy FCR, BR, O-C1b a R-C1b. Dávkování režimů FCR a BR odpovídá dávkování ve studii CLL10 (21). Dávkování O-C1b odpovídá dávkování ve studii CLL11 a dávkování R-C1b tomu ve studii CLL208 (22, 203). Podrobné dávkování je uvedeno v příloze 11.3. Z běžné lékařské dokumentace v nemocničním informačním systému byla shromážděna další potřebná data o průběhu choroby: krevní obraz a stádium dle Raie v době odběru krve, data o infekčních komplikacích, mutační stav IGHV, přítomnost mutace *TP53* vedoucí k jeho dysfunkci (vyšetřováno Sangerovou sekvenací), data o chromozomálních aberacích (vyšetřováno stimulovaným karyotypem a fluorescenční in situ hybridizací [FISH]) a data o léčebné odpovědi. Dále datum poslední kontroly, případně zahájení následující léčby a úmrtí. Na základě těchto dat pak byly vypočítány TTFT a OS u nemocných s neaktivní chorobou, kteří nebyli léčeni a čas do další léčby (time to next treatment, TTNT) a OS u nemocných s progredující chorobou, indikovaných k léčbě. Tyto intervaly jsou v práci definovány nikoliv jako časy od data diagnózy, ale jako časy od okamžiku odběru krve do příslušné události. Tento způsob dle mého názoru lépe odráží případný vztah

těchto časů ke zkoumaným parametrům imunitního systému, které mohly mít v době diagnózy zcela jiné hodnoty (u části pacientů od diagnózy do vstupu do studie uplynulo i několik let).

6.1. Laboratorní metody

6.1.1. Analýza buněčných populací průtokovou cytometrií

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

Při povrchovém barvení buněk bylo 50 µl nesrážlivé krve přidáno do zkumavky s 5 µl fluorochromem značené protilátky. Byly použity následující protilátky: anti-CD3 Phycoerythrin-Texas Red-x (ECD), clone UCHT1; anti-CD4 Krome Orange (KrO), clone 13B8.2; anti-CD19 phycoerythrin-cyanin 7 (PC7), clone J3-119; anti-CD20 Pacific Blue (PB), clone B9E9; anti-CD5 Phycoerythrin-cyanin 5.5 (PC5.5), clone BL1a; anti-kappa chain Fluorescein Isothiocyanate (FITC), isotype F(ab')₂ Goat; anti-lambda chain Phycoerythrin (PE), isotype F(ab')₂ Goat; anti-CD8 Fluorescein Isothiocyanate (FITC), clone B9.11; anti-CD8 Allophycocyanin (APC), clone B9.11; anti-CD16 Phycoerythrin (PE), clone 3G8; anti-CD25 PE, clone B1.49.9; anti-CD27 allophycocyanin-Alexa Fluor 750 (APC-A750), clone 1A4CD27; anti-CD28 Phycoerythrin-cyanin 5.5 (PC5.5), clone CD28.2; anti-CD45 KrO, clone J33; anti-CD45RA phycoerythrin-cyanin 7 (PC7), clone 2H4LDH11LDB9; anti-CD45RO FITC, clone UCHL1; anti-CD56APC, clone N901 (NKH-1); anti-CD57 Pacific Blue (PB), clone NC1; anti-CD127 PC7, clone R34.34; anti-CD197 (CCR7) PE, clone G043H7; anti-FoxP3 Alexa Fluor 488 (AF488), clone PCH101. Protilátka anti-FoxP3 AF488 byla zakoupena od výrobce eBioscience (San Diego, CA, USA), všechny ostatní protilátky od Beckman Coulter (Miami, FL, USA).

Jednotlivé buněčné populace byly definovány následujícími kombinacemi znaků: lymfocyty (nízký side scatter/CD45⁺⁺), T-ly (CD3⁺), NK buňky (CD3⁻CD16⁺ a/nebo CD56⁺), NKT buňky (CD3⁺CD56⁺), pomocné CD4⁺ T-ly (CD3⁺CD4⁺), cytotoxické CD8⁺ T-ly (CD3⁺CD8⁺), B-ly (CD19⁺), klonální B-ly (CD19⁺, CD5⁺, CD20^{low}, restrikce kappa/lambda), polyklonální B-ly (CD19⁺, CD20⁺, normální poměr kappa/lambda), naivní CD4⁺ T-ly (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD197⁺), CD4⁺ TCM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD197⁺), CD4⁺ TEM (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD197⁻), CD4⁺ TEMRA (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD197⁻), naivní CD8⁺ T-ly (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD197⁺), CD8⁺ TCM

(CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD197⁺), CD8⁺ TEM (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD197⁻), CD8⁺ TEMRA (CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD197⁻), T-reg (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺).

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

6.1.2. Analýza sérových koncentrací imunoglobulinů

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

6.2. Statistické zpracování

Veškeré statistické analýzy byly provedeny v programu MedCalc, verze 20 firmy MedCalc Software Ltd (Mariakerke, Belgium). Shapiro-Wilkův test byl použit k posouzení normality rozložení dat. V případě, že obě srovnávané populace měly normální rozložení dat, byl k jejich srovnání použit nepárový t-test v případě nezávislých vzorků, respektive párový t-test při srovnání párových vzorků (srovnání hodnot před léčbou a po léčbě) a v práci jsou udávány aritmetické průměry dat srovnávaných populací. V případě nenormálního rozložení dat jedné, či obou srovnávaných populací byl k jejich srovnání následně použit Mann-Whitneyův U test v případě nezávislých vzorků, respektive Wilcoxonův test při srovnání párových vzorků a v práci jsou udávány mediány dat srovnávaných populací. Graficky jsou v práci výsledky vyjádřeny ve formě krabicových grafů, kde krabicová část reprezentuje interkvartilové rozpětí a vousy jsou vykresleny ve vzdálenosti 1,5 násobku interkvartilového rozpětí od 1. a 3. kvartilu.

Coxův model proporcionálních rizik byl použit k posouzení vlivu jednotlivých parametrů imunitního systému na TTFT, TTNT a OS. V případě, že bylo při použití Coxova modelu více různých proměnných statisticky signifikantních, byla provedena multivariantní analýza pouze s těmito proměnnými. U statisticky signifikantních proměnných byla dále provedena ROC (Receiver Operating Characteristic) analýza k určení takové hodnoty zkoumaného parametru imunity, která by nejlépe umožnila rozdělit danou populaci pacientů na dvě skupiny s odlišným časy TTFT, TTNT, či OS. Časy těchto dvou skupin pak byly srovnány log-rank testem a byly zkonstruovány Kaplan-Meierovy křivky. Všechny hypotézy byly testovány na hladině významnosti 0,05.

6.3. Charakteristika souboru nemocných

Od září 2013 do května 2019 bylo do studie zařazeno celkem 129 pacientů, kteří byly sledovány do listopadu 2020. Jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 2. Jako kontrolní skupina pro vyšetření buněčných populací bylo použito 34 zdravých dárců krve odebraných na transfúzní stanici (medián věku 60 let (rozpětí 43-67), 56% mužů). Celkem 45 nemocných mělo v době odběru neaktivní chorobu neindikovanou k léčbě. Dalších 90 nemocných bylo odebráno v době aktivity choroby (s indikací k léčbě). Z těchto 90 bylo 6 již předtím odebráno v době neaktivní choroby. Data těchto 6 nemocných byla použita pouze ke srovnání s kontrolami, nikoliv ke srovnání s nemocnými s neaktivní chorobou (aby nebyli srovnáváni sami se sebou v jiném časovém bodě). Z 90 pacientů odebraných před léčbou proběhl opakovaný odběr po léčbě u 58. Celkem 18 pacientů bylo vyloučeno, protože byli léčeni jinou léčbou než FCR, BR, O-Clb, nebo R-Clb (nejčastěji cílenou léčbou nebo režimem s kortikosteroidy) a příliš velká variabilita léčebných modalit by neumožnila validní statistickou analýzu. Dalších 14 pacientů nebylo po léčbě odebráno z jiných důvodů (odmítli další odběr, zemřeli, vzorek byl ztracen apod.). Schéma odběrů nemocných ve studii ukazuje obrázek 1. Režimem FCR bylo léčeno 20 nemocných, režimem BR 18, režimem O-Clb 9 a režimem R-Clb 11 nemocných. Léčebná odpověď (kompletní, nebo parciální remise) byla dosažena u všech pacientů léčených FCR, 16/18 pacientů léčených BR, 8/9 pacientů léčených O-Clb a 8/11 pacientů léčených R-Clb. Charakteristiky pacientů odebraných před a po léčbě rozdělených dle léčebného režimu jsou uvedeny v tabulce 3. Nikdo z pacientů zařazených do studie nedostával žádnou formu substituce Ig.

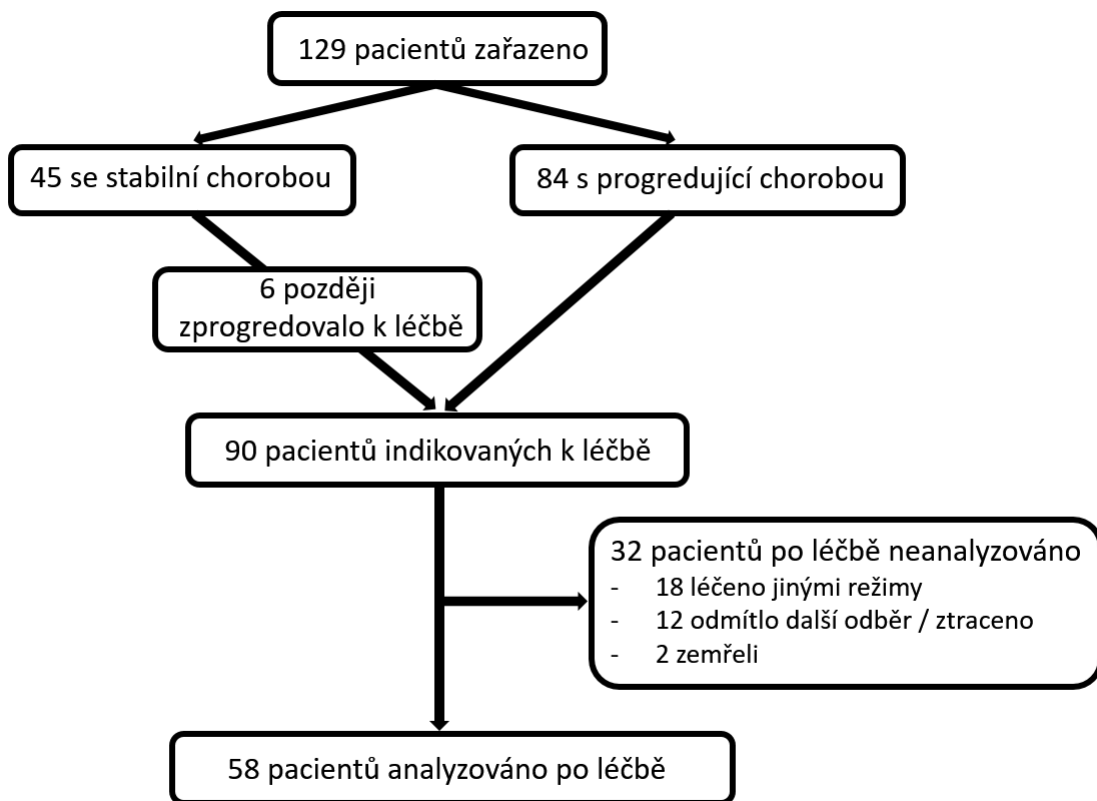
Tabulka 2. Charakteristiky jednotlivých kohort pacientů. Data z kohorty "nemocní analyzovaní po léčbě" odpovídají hodnotám naměřeným před zahájením léčby.

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

Tabulka 3. Charakteristiky pacientů odebraných před a po léčbě rozdělených dle léčebného režimu.

Charakteristika	FCR	BR	O-Clb / R-Clb
Počet	20	18	20
Věk v době odběru, medián (rozpětí)	62 let (43-69)	67 let (54-72)	76 let (64-87)
Muži	14 (70%)	10 (56%)	10 (50%)
Medián sledování od data odběru	24 měsíců	45 měsíců	28 měsíců
Medián času od diagnózy do data odběru (rozpětí)	41 měsíců (4-172)	17 months (1-110)	54 měsíců (0-174)
Modifikované riziko dle Raie v době odběru			
- nízké (stádium 0)	0	0	1 (5%)
- střední (stádium I-II)	11 (55%)	7 (39%)	5 (25%)
- vysoké (stádium III-IV)	9 (45%)	11 (61%)	14 (70%)
IGHV			
- mutované	2 (10%)	3 (17%)	7 (35%)
- nemutované	16 (80%)	12 (67%)	8 (40%)
- není k dispozici	2 (10%)	3 (17%)	5 (25%)
<i>TP53</i>			
- mutovaný	0	1 (6%)	4 (20%)
- nemutovaný	15 (75%)	13 (72%)	13 (65%)
- není k dispozici	5 (25%)	4 (22%)	3 (15%)
FISH			
- normální	5 (25%)	5 (28%)	5 (25%)
- delece 13q	4 (20%)	8 (44%)	5 (25%)
- trisomie 12	4 (20%)	2 (11%)	3 (15%)
- delece 11q	6 (30%)	2 (11%)	1 (5%)
- delece 17p	0	1 (6%)	1 (5%)
- není k dispozici	1 (5%)	0	4 (20%)
mutace <i>TP53</i> nebo delece 17p	0	2 (11%)	4 (20%)

Obrázek 1. Schéma odběrů nemocných ve studii.



7. Výsledky

7.1. Sérové koncentrace imunoglobulinů

Z analýz byly vyloučeny výsledky koncentrací tříd a podtříd Ig pacientů, kteří měli v dané třídě detekován paraprotein. V kohortě pacientů s neaktivní chorobou byl u jednoho nemocného zjištěn paraprotein IgG. Mezi pacienty s progredující chorobou byly paraproteiny ve třídách IgG / IgA / IgM detekovány v 7 / 1 / 5 případech. Mezi nemocnými analyzovanými před a po léčbě byly paraproteiny ve třídách IgG / IgA / IgM detekovány u 3 / 0 / 3 pacientů. Celkem 3 nemocní z kohorty progredujících pacientů rovněž analyzovaní po léčbě neměli z technických důvodů proveden odběr koncentrace Ig (měli však vyšetřeny populace lymfocytů), takže pro srovnání s nemocnými s neaktivní chorobou jich bylo k dispozici 81 a pro posouzení efektu léčby 55. Frekvenci výskytu hypogamaglobulinémie v celém souboru zobrazuje přehledně tabulka 4.

Tabulka 4. Frekvence výskytu hypogamaglobulinémie. Celkový počet posuzovaných případů je jiný nejen v každé kohortě pacientů, ale vzhledem k vyřazení případů s paraproteinem také pro každou třídu a podtřidu Ig.

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

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

Nemocní s progredující chorobou (n=81) měli výrazně nižší koncentrace všech tříd i podtříd Ig, než nemocní s neaktivní chorobou (n=45) – viz tabulka 5 a obrázek 2 a 3. Při srovnání hodnot Ig před a po léčbě (párové vzorky, n=55) byl jedinou statisticky významnou změnou vzestup IgA – viz tabulka 6 a obrázek 2 a 3. Při srovnání nemocných s neaktivní chorobou a pacientů po léčbě byly pak hodnoty všech tříd Ig s výjimkou IgG3 statisticky významně nižší u léčených nemocných – viz tabulka 7 a obrázek 2 a 3.

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

Tabulka 5. Srovnání nemocných s neaktivní a progredující chorobou. Kvantity Ig jsou vyjádřeny jako mediány souboru v g/l. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

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

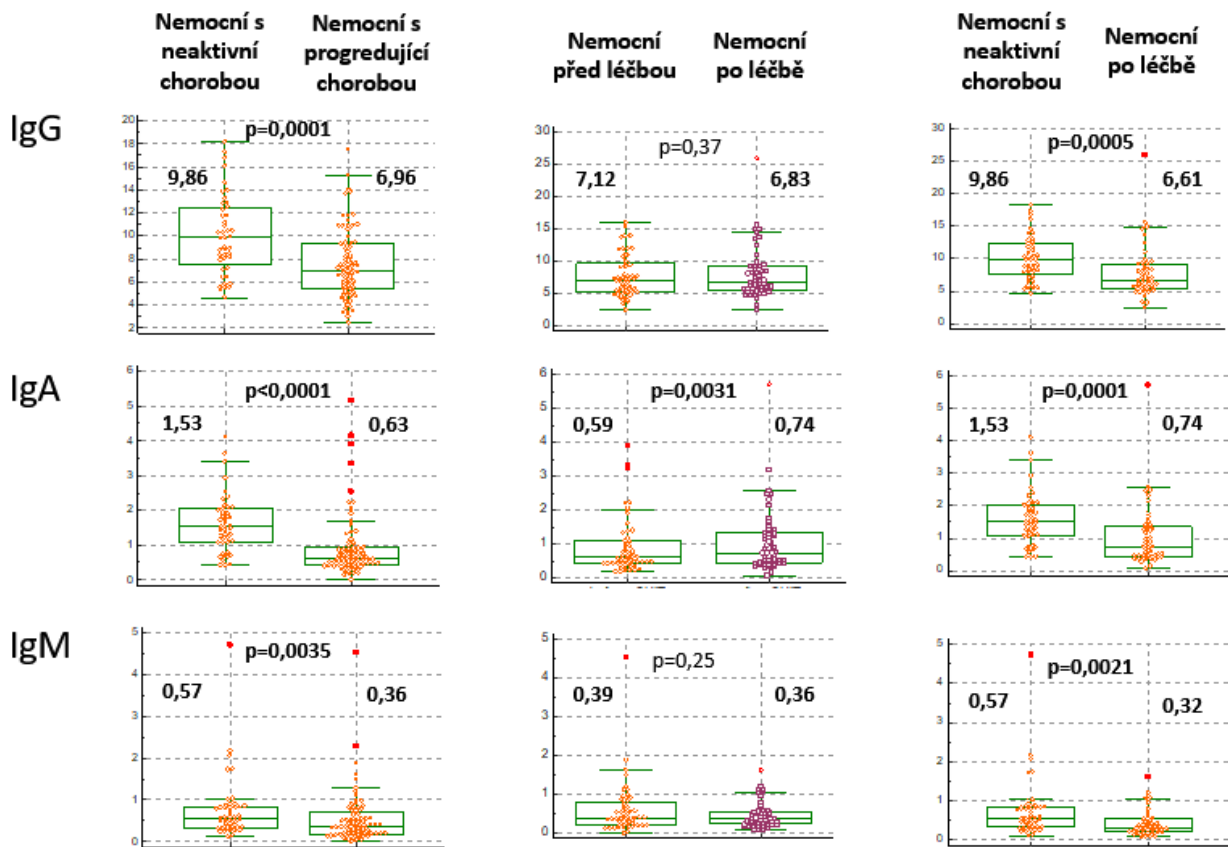
Tabulka 6. Srovnání nemocných před léčbou a po léčbě. Kvantity Ig jsou vyjádřeny jako mediány souboru v g/l. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

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

Tabulka 7. Srovnání nemocných s neaktivní chorobou a po léčbě. Kvantity Ig jsou vyjádřeny jako mediány souboru v g/l. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

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

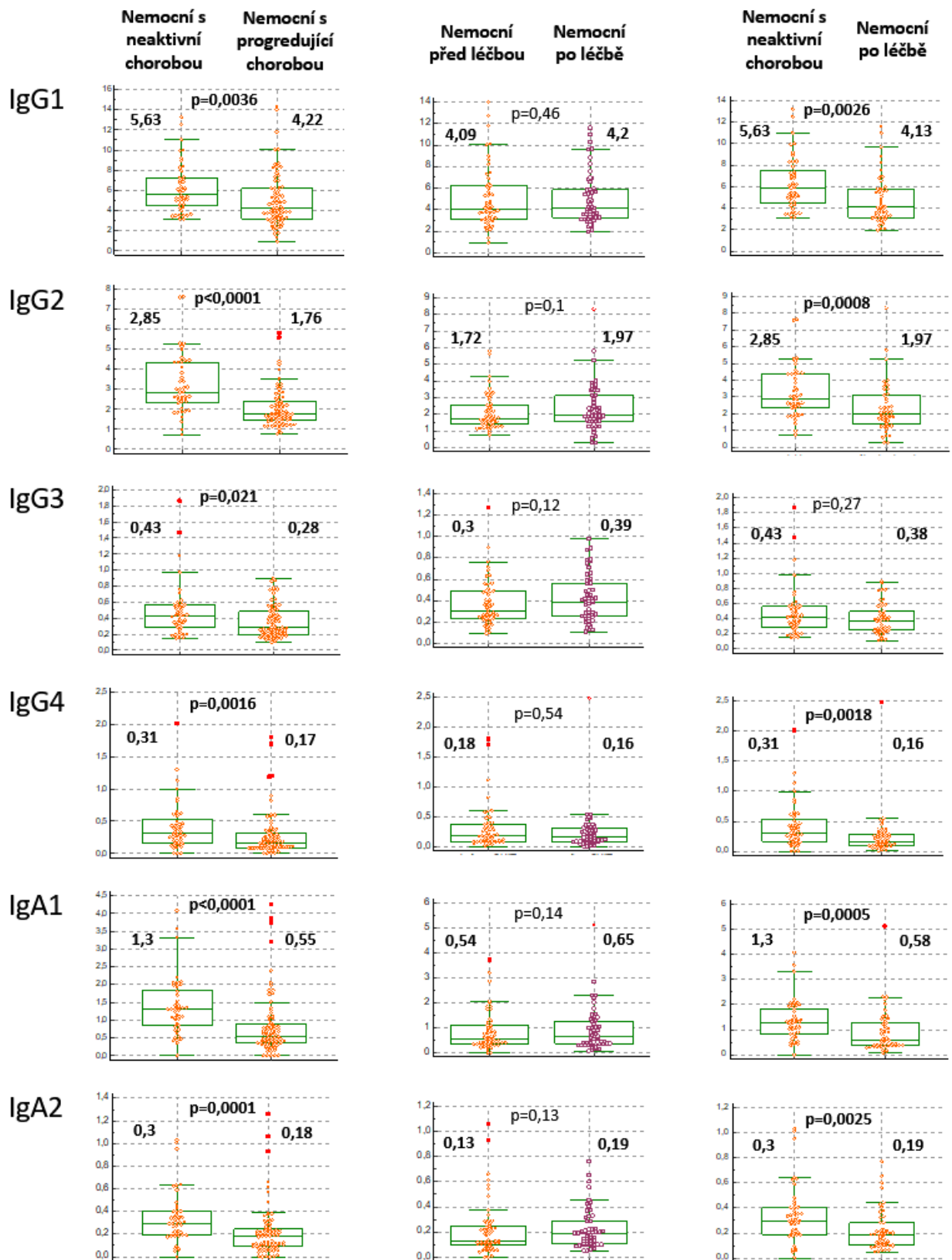
Obrázek 2. Krabicové grafy ukazující změny koncentrací hlavních tříd Ig při progresi a po léčbě. Kvantity Ig jsou vyjádřeny jako mediány souboru v g/l. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.



7.1.2. Souvislost koncentrací imunoglobulinů a infekčních komplikací

Byly srovnány koncentrace Ig nemocných s neaktivní chorobou, kteří prodělali (n=22) a neprodělali (n=23) infekční komplikaci v období 3 let před odběrem krve k vyšetření. Počet a typ infekčních komplikací je přehledně uveden v tabulce 8. V koncentracích Ig nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Obdobně byly srovnány koncentrace Ig nemocných s progredující chorobou, kteří prodělali (n=29) vs. neprodělali (n=58) infekční komplikaci v období 3 let před odběrem krve k vyšetření. Vzhledem k tomu, že 9 pacientů mělo infekci vícekrát, bylo zaznamenáno celkem 48 infekčních epizod, které jsou opět shrnuty v tabulce 8. Ani zde nebyl mezi nemocnými s a bez infekce pozorován statisticky významný rozdíl v koncentracích Ig. Byla zaznamenávána i závažnost infekcí. Vzhledem k tomu, že závažné infekce (vyžadující hospitalizaci či léčbu i.v. antibiotiky) se vyskytly pouze ve 4 případech u nemocných s neaktivní chorobou a v 6 případech u nemocných s progredující chorobou, nebyly samostatně statisticky analyzovány.

Obrázek 3. Krabicové grafy ukazující změny koncentrací podtříd Ig při progresi a po léčbě. Kvantity Ig jsou vyjádřeny jako mediány souboru v g/l. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.



Tabulka 8. Přehled infekčních epizod u nemocných ve studii.

Typ infekce	Počet epizod
nemocní s neaktivní chorobou	
infekce horních cest dýchacích a bronchitidy	12
herpes labialis	3
infekce močových cest	2
pneumonie; sepse; infekční endokarditida; erysipel; herpes zoster	1
nemocní s progredující chorobou	
infekce horních cest dýchacích a bronchitidy	21
pneumonie	10
herpes labialis	4
flegmóna měkkých tkání	3
herpes zoster; horečka neznámého původu	2
infekce močových cest; peritonsilární absces; gastroenteritida; soor dutiny ústní; klostridiová kolitida; cytomegalovirová stomatitida	1

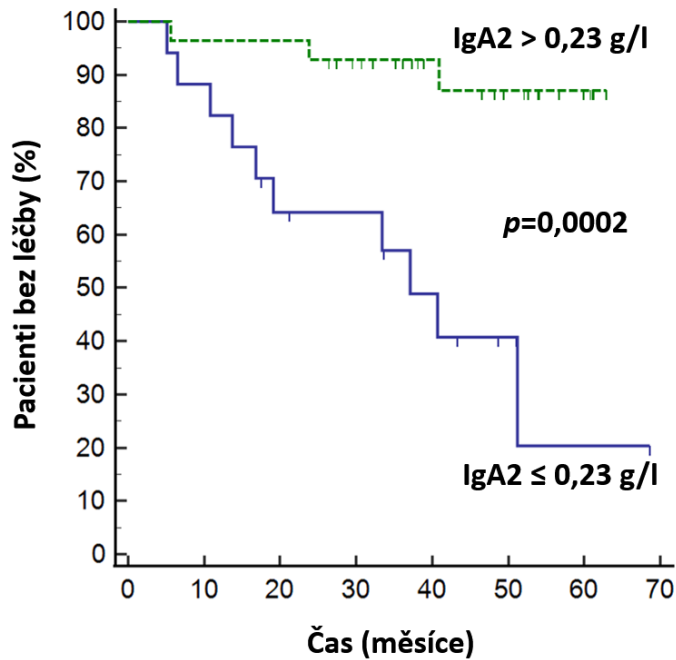
7.1.3. Prognostický význam sérových koncentrací imunoglobulinů

Ze 45 nemocných s neaktivní chorobou došlo k progresi s nutností k léčbě během sledování u 12 z nich (6 z nich přitom bylo v rámci studie znovu odebráno, zbylých 6 progredovalo až po ukončení fáze odběru vzorků, byli však nadále sledováni). TTFT, resp. přežití bez léčby ve třech letech bylo 79 %. Žádná z koncentrací Ig neměla statisticky významný vliv na TTFT, nicméně v případě IgA2 zde byl jasně patrný trend k rychlejší progresi k léčbě u nemocných s nižší koncentrací ($p=0,056$). ROC analýzou byla jako nejlepší cut-off hodnota k rozdělení kohorty na skupiny s rozdílným TTFF určena kvantita IgA2 0,23 g/l. Rozdíl v přežití bez léčby na základě tohoto rozdělení ukazuje obrázek 4. OS u nemocných s neaktivní chorobou nebylo analyzováno, protože v průběhu sledování zemřeli pouze 3 z nich.

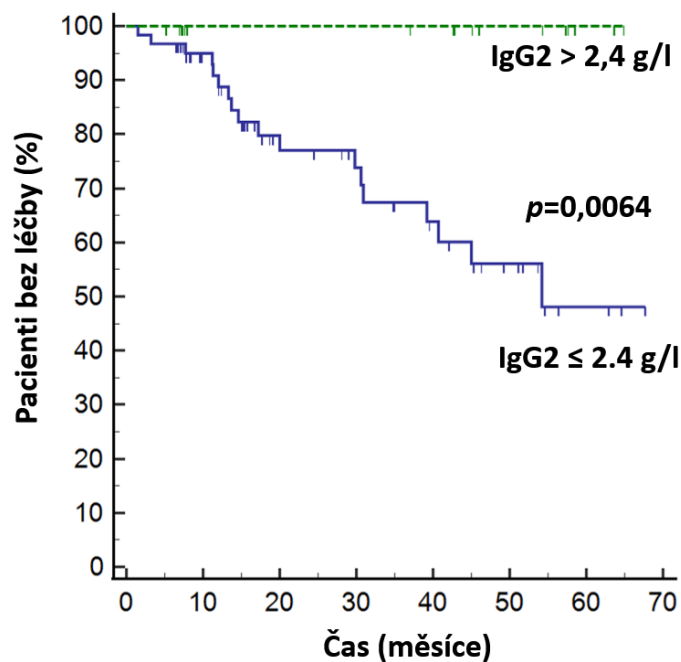
Z 87 nemocných s progredující chorobou jich zemřelo v průběhu sledování 18, OS ve třech letech bylo 78 %. Nižší koncentrace IgG2 zde byla spojena s kratším OS ($p=0,043$). ROC analýzou byla jako nejlepší cut-off hodnota k rozdělení kohorty na skupiny s rozdílným OS určena kvantita IgG2 2,4 g/l. Rozdíl v OS na základě tohoto rozdělení ukazuje obrázek 5. Souvislost koncentrací Ig a TTNT této kohorty nebyla zjištěna.

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

Obrázek 4. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s $\text{IgA2} \leq 0,23 \text{ g/l}$ a $\text{IgA2} > 0,23 \text{ g/l}$. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl ($p=0,0002$).



Obrázek 5. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující OS nemocných s progredující chorobou s $\text{IgG2} \leq 2,4 \text{ g/l}$ a $\text{IgG2} > 2,4 \text{ g/l}$. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl ($p=0,0064$).



7.1.4. Souvislost sérových koncentrací imunoglobulinů a prognostických ukazatelů

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

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

7.2. Buněčné populace

Celkem 4 nemocní z kohorty progredujících pacientů neměli z technických důvodů vyšetření buněčných populací průtokovou cytometrií provedeno. Z celkového počtu nemocných ve studii jich tedy bylo pro srovnání s nemocnými s neaktivní chorobou k dispozici 80 (resp. po započtení nemocných odebraných i v době neaktivní choroby 86 pro srovnání s kontrolami). Odběr buněčných populací před i po léčbě byl k dispozici u 55 nemocných. Mimo to se jednalo o stejné nemocné jako při vyšetření koncentrací Ig (viz tabulka 2 a obrázek 1). Dále je třeba uvést, že vyšetření NKT buněk bylo z technických důvodů provedeno jen u 15 nemocných s neaktivní a 34 nemocných s progredující chorobou.

7.2.1. Poměry zastoupení buněčných populací a jejich prognostický význam

U nemocných i kontrol byly vypočítány poměry absolutního počtu $CD4^+$ T-ly k absolutnímu počtu $CD8^+$ T-ly a také poměry absolutního počtu $CD4^+$ T-ly, $CD8^+$ T-ly, celkových T-ly, NK a NKT buněk k absolutnímu počtu klonálních B-ly. Výsledné poměry pak byly srovnány mezi

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

Co se týče poměrů mezi absolutními počty CD4⁺ T-ly, CD8⁺ T-ly, celkových T-ly, NK a NKT buněk a absolutním počtem klonálních B-ly, byly provedeny pouze porovnání mezi nemocnými s aktivní a progredující chorobou – kontroly klonální B-ly nemají a u nemocných po léčbě byla jejich populace v drtivé většině případů téměř nulová. U všech těchto srovnání pak byl zjištěn statisticky významně vyšší medián poměrů u nemocných s neaktivní chorobou. Přesné hodnoty mediánů i rozpětí poměrů a p-hodnoty srovnání ukazuje tabulka 9.

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

Tabulka 9. hodnoty mediánů i rozpětí poměrů jednotlivých buněčných populací a p-hodnoty srovnání mezi nemocnými s neaktivní a progredující chorobou.

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

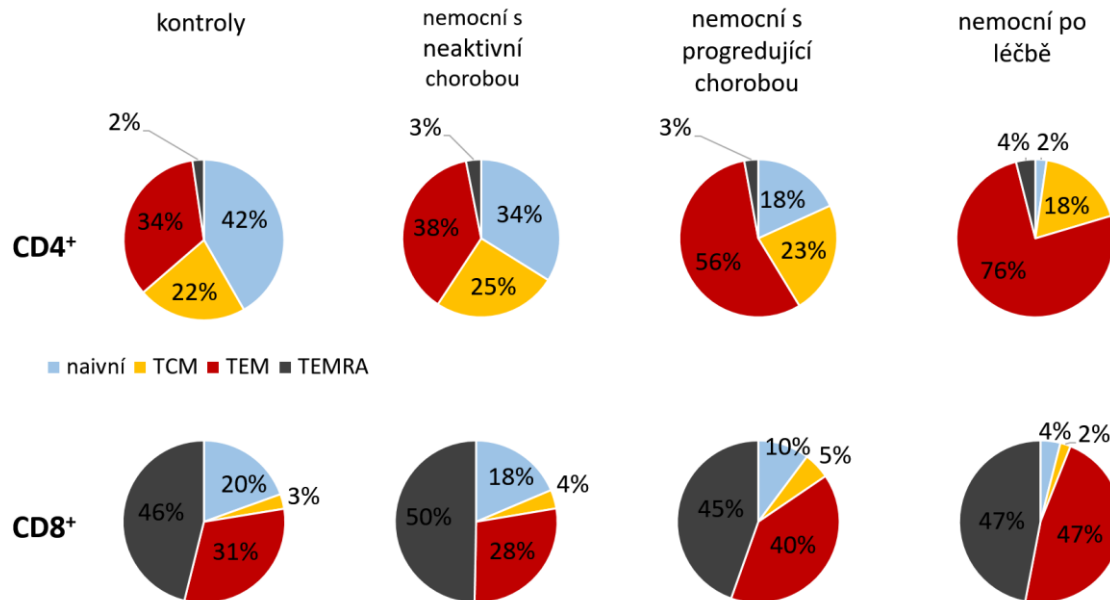
7.2.2. Změny jednotlivých buněčných populací při progresi onemocnění

Pacienti s neaktivní chorobou měli ve srovnání s kontrolami statisticky významně nižší relativní počty všech hlavních buněčných populací, tedy celkových T-ly, polyklonálních B-ly, NK buněk, CD4⁺ T-ly, CD8⁺ T-ly, CD4⁺CD8⁺ T-ly, CD4⁺CD8⁻ T-ly i NKT buněk, což bylo dáno přítomností klonálních B-ly u nemocných – viz tabulka 10. Relativní počty uvedených populací jsou totiž vyjádřeny jako % z celkového počtu lymfocytů a jsou tedy počtem klonálních B-ly významně ovlivněny – viz výše kapitola 6.1.1. Výjimkou je relativní počet T-reg, který je vyjádřen jako % z celkového počtu CD4⁺ buněk, a není tak klonálními B-ly ovlivněn. Zde byl relativní počet buněk vyšší u nemocných, než u kontrol. Absolutní počty hlavních buněčných populací s výjimkou CD4⁺CD8⁺T-ly a polyklonálních B-ly byly u nemocných s neaktivní chorobou naopak statisticky významně vyšší, než u kontrol. Co se týče funkčních subpopulací, měli nemocní s neaktivní chorobou ve srovnání s kontrolami statisticky významně vyšší relativní počet CD4⁺ TCM a absolutní počty CD4⁺ TCM, CD8⁺ TCM a CD8⁺ TEMRA. Změny v poměrech funkčních subpopulací shrnuje obrázek 6.

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

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

Obrázek 6. Koláčové grafy zobrazující poměry jednotlivých funkčních subsetů buněk v jednotlivých kohortách pacientů a u kontrol. % uvedená v grafech jsou vypočítána jako medián z absolutních počtů buněk.



Při srovnání absolutních i relativních počtů hlavních buněčných populací nemocných s progredující chorobou (n=86) a kontrol byly patrné obdobné rozdíly jako mezi nemocnými s neaktivní chorobou a kontrolami, byly ale ještě výraznější – viz tabulka 11. Stran funkčních subpopulací byly opět patrné obdobné rozdíly jako mezi kontrolami a nemocnými s neaktivní chorobou, navíc však měli nemocní s progredující chorobou také vyšší absolutní počty CD4⁺ TEM, CD4⁺ TEMRA a CD8⁺ TEM, takže pouze počet naivních buněk zůstal srovnatelný jako u kontrol. Relativní počty naivních buněk pak byly jak v CD4⁺ tak v CD8⁺ kompartmentu u nemocných s progredující chorobou statisticky významně nižší, než u kontrol, relativní počty CD4⁺ TEM a CD8⁺ TCM zase vyšší – viz tabulka 11 a obrázek 6.

Tabulka 11. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými s progredující chorobou a kontrolami. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

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

Srovnání byli také pacienti s neaktivní (n=45) a progredující chorobou (n=80) mezi sebou. Výsledky tohoto srovnání shrnuje tabulka 12 a obrázek 6. Progredující nemocní měli vyšší absolutní počet buněk ve všech hlavních populacích kromě polyklonálních B-ly, CD4⁺CD8⁺ T-ly, NK a NKT buněk. Relativní počty byly naopak u progredujících pacientů nižší kvůli vyššímu počtu klonálních B-ly. Výjimkou byly opět T-reg, jejichž zastoupení v rámci CD4⁺ T-ly bylo u progredující choroby vyšší. Nemocní s progredující chorobou měli dále statisticky významně vyšší absolutní počty CD4⁺ TCM, CD4⁺ TEM, CD8⁺ TCM, CD8⁺ TEM a CD8⁺ TEMRA. Relativní počty naivních CD4⁺ i CD8⁺ buněk byly u progredující choroby významně nižší, zatímco podíl CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEM naopak vyšší, než u nemocných s neaktivní chorobou. Také relativní počet CD8⁺ TEMRA byl navzdory jejich vyššímu absolutnímu počtu u progredujících nemocných nižší a to v důsledku relativně významnějšího vzestupu absolutního počtu CD8⁺ TCM a CD8⁺ TEM ve srovnání s neaktivní chorobou. Přehled srovnání funkčních subsetů mezi jednotlivými kohortami pacientů ukazuje tabulka 13.

Tabulka 12. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými s neaktivní a progredující chorobou. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

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

Tabulka 13. Přehled srovnání funkčních subpopulací mezi jednotlivými kohortami pacientů. ~ symbolizuje, že mezi skupinami není statisticky významný rozdíl. ↑ a ↓ symbolizuje, že kohorta uvedená v levém sloupci na 1. místě má statisticky významně vyšší absolutní, nebo relativní počet (%) příslušných buněk, než kohorta uvedená na 2. místě.

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

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

Za účelem posouzení efektu léčby 1. linie pomocí CHIT byly analyzovány párové vzorky z odběrů před a po léčbě u 55 nemocných. Výsledky shrnuje tabulka 14. Absolutní počty všech hodnocených buněčných populací statisticky významně poklesly. Relativní zastoupení funkčních subpopulací se změnilo ve prospěch TEM buněk na úkor naivních a TCM buněk v CD4⁺ i CD8⁺ kompartmentu – viz tabulka 13 a obrázek 6. Relativní počet TEMRA buněk se vlivem léčby statisticky významně nezměnil.

Výsledky nemocných po léčbě byly také porovnány s hodnotami nemocných s neaktivní chorobou a s hodnotami zdravých kontrol – viz tabulky 15 a 16. Absolutní počty všech analyzovaných populací kromě CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEM poklesly po léčbě pod úroveň pozorovanou u nemocných s neaktivní chorobou. Také ve srovnání s kontrolním souborem, který měl obecně nižší absolutní počty buněk než nemocní s neaktivní chorobou, byly počty buněk po léčbě srovnatelné, nebo dokonce ještě nižší (signifikantně nižší v případě celkových T-ly, CD4⁺ T-ly, CD4⁻CD8⁻ T-ly, polyklonálních B-ly, NKT buněk, naivních CD4⁺, TCM a TEMRA buněk a naivních CD8⁺ buněk).

Navzdory poklesu absolutního počtu T-reg po léčbě až na úroveň srovnatelnou s kontrolami, zůstal relativní počet T-reg po léčbě statisticky významně vyšší, než u kontrol, protože počet ostatních CD4⁺ T-ly pokles ještě víc. Pacienti po léčbě měli dále nižší zastoupení CD4⁺ i CD8⁺ naivních a TCM buněk, než pacienti s neaktivní chorobou, a naopak vyšší podíl CD4⁺ i CD8⁺ TEM buněk, než pacienti s neaktivní chorobou i kontroly. Popsané změny opět shrnují tabulka 13 a obrázek 6. Výše uvedené výsledky jsou graficky zpracovány v obrázcích 7-10.

Tabulka 14. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými před a po léčbě. Absolutní počty jsou vyjádřeny v 10⁹/l, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

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

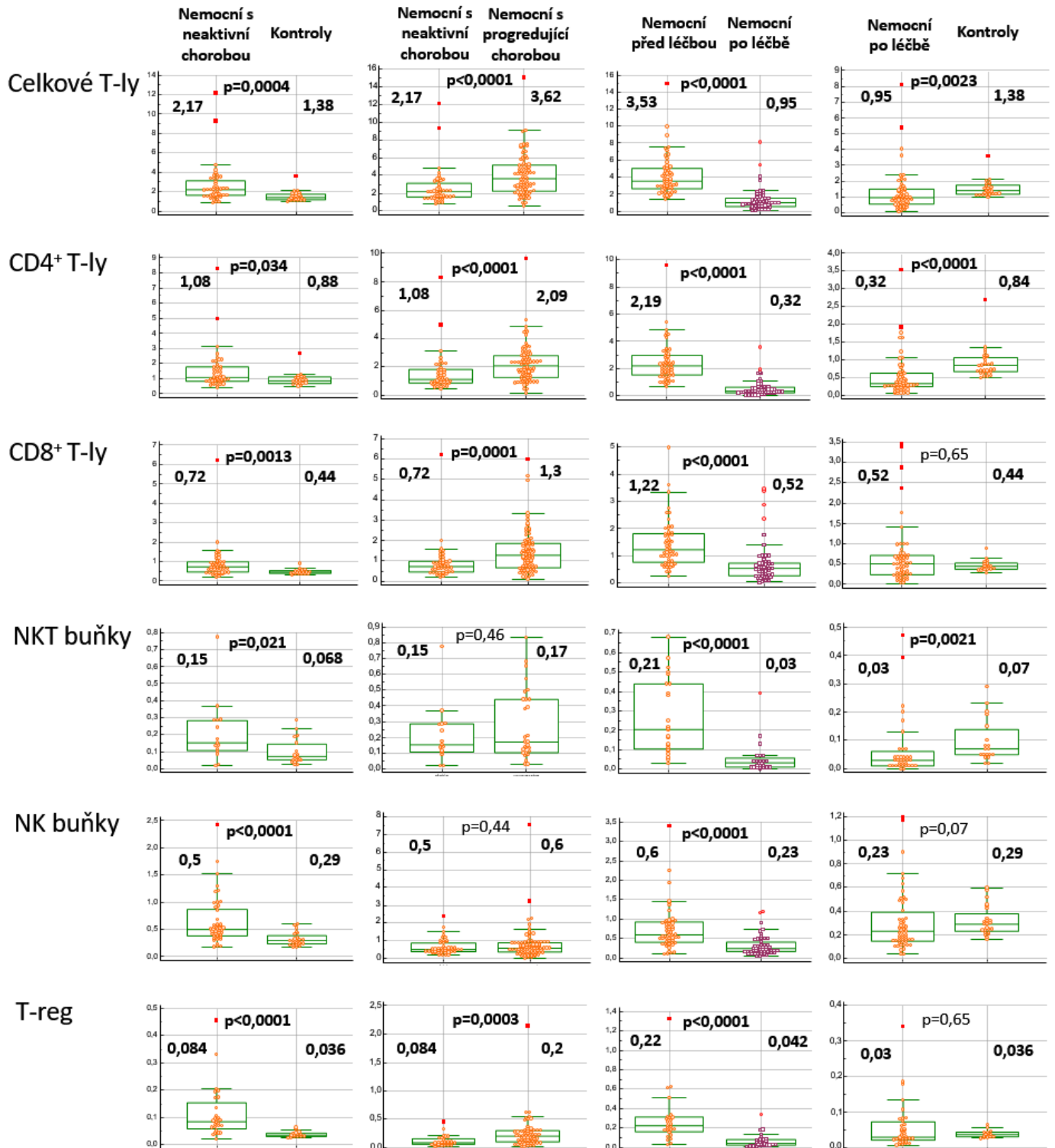
Tabulka 15. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými s neaktivní chorobou a nemocnými po léčbě. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

Buněčná populace	nemocní s neaktivní chorobou		nemocní po léčbě		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	2,17	7,8	0,95	75,21	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ T-ly	1,08	4,54	0,34	26,07	<0,0001	<0,0001
CD8 ⁺ T-ly	0,72	2,5	0,52	37,99	0,016	<0,0001
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,013	0,08	0,01	0,45	0,0008	<0,0001
CD4 ⁺ CD8 ⁻ T-ly	0,089	0,4	0,01	1,11	<0,0001	<0,0001
celkové B-ly	15,93	89,7	0	0,05	<0,0001	<0,0001
klonální B-ly	15,82	89,56	0	0	<0,0001	<0,0001
polyklonální B-ly	0,048	0,18	0	0	<0,0001	<0,0001
NKT buňky	0,15	0,5	0,03	1,77	0,0009	0,0013
NK buňky	0,5	2,38	0,23	15,97	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ naivní	0,36	35,62	0,007	2,43	<0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ TCM	0,27	24,54	0,055	13,83	0,0001	<0,0001
CD4 ⁺ TEM	0,4	32,54	0,23	76,64	0,068	<0,0001
CD4 ⁺ TEMRA	0,033	2,4	0,012	3,69	0,0023	0,13
CD8 ⁺ naivní	0,12	16,7	0,016	3,16	<0,0001	<0,0001
CD8 ⁺ TCM	0,024	3,28	0,0084	1,61	0,0009	0,026
CD8 ⁺ TEM	0,18	27,73	0,19	44,73	0,98	<0,0001
CD8 ⁺ TEMRA	0,32	48,8	0,19	40,29	0,033	0,24
T-reg	0,084	7,28	0,037	13,35	0,0006	0,0004

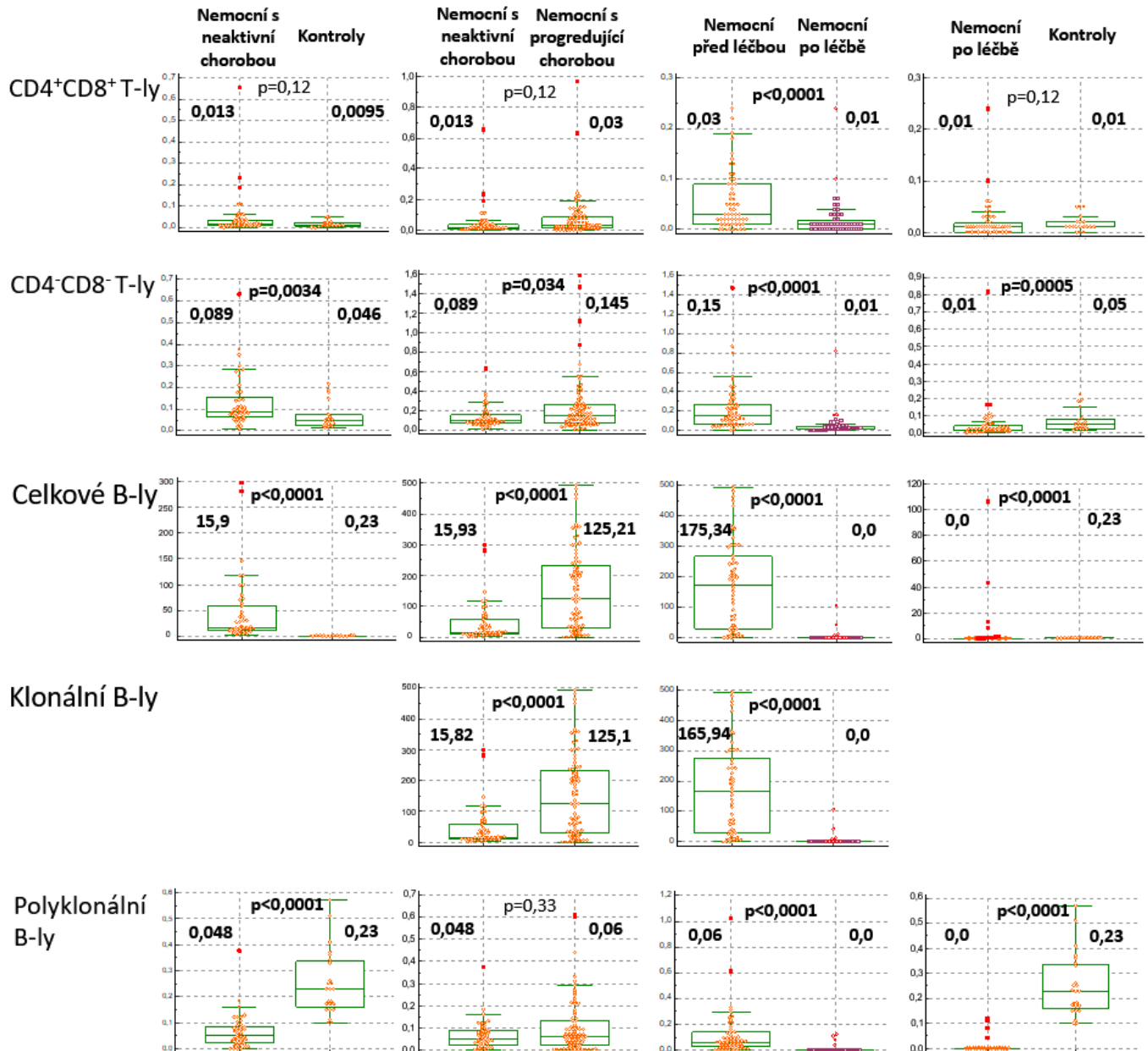
Tabulka 16. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými po léčbě a zdravými kontrolami. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

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

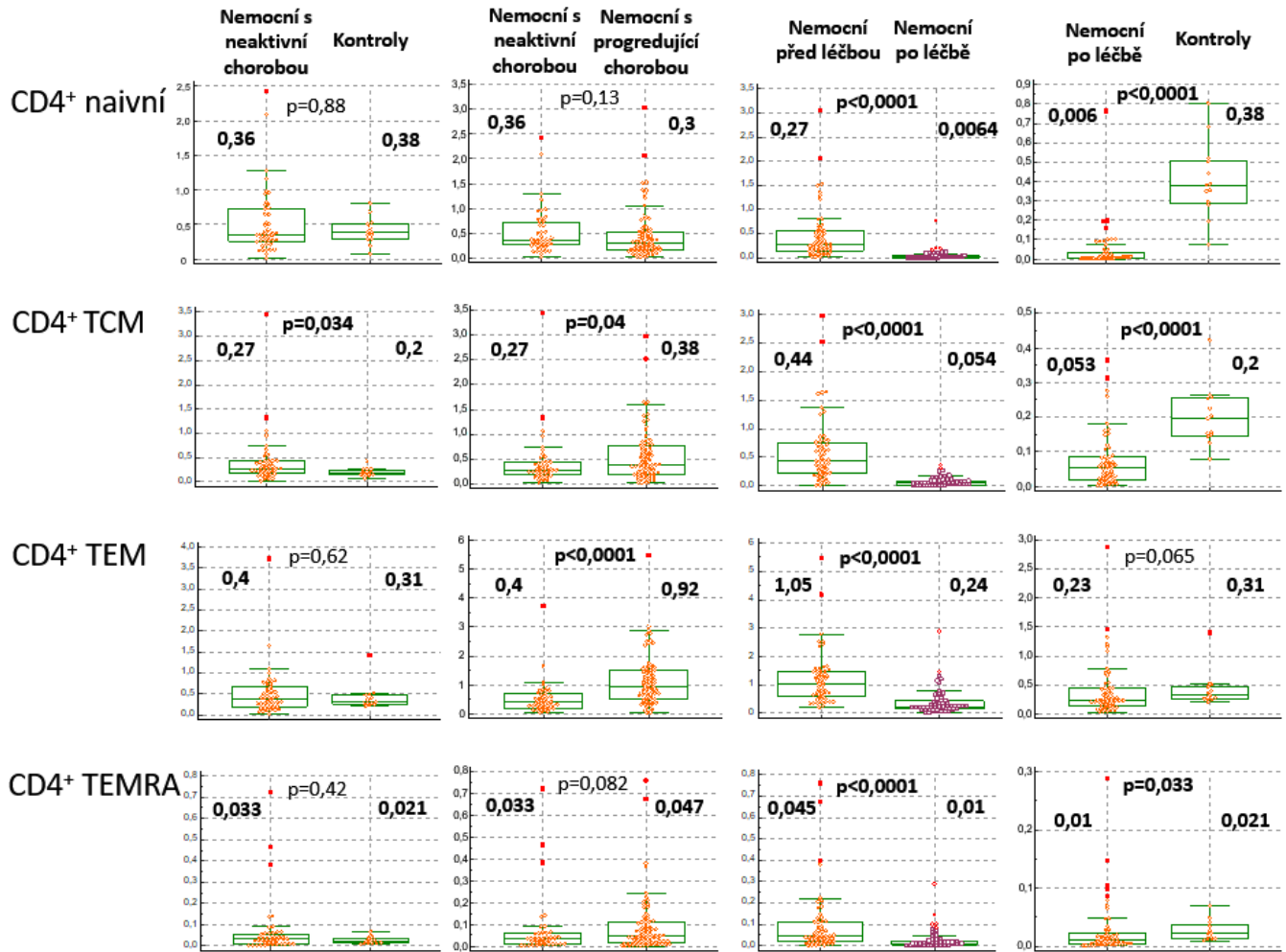
Obrázek 7. Krabicové grafy ukazující změny absolutních počtů hlavních buněčných populací při progresi a po léčbě. Počty buněk jsou vyjádřeny jako mediány souboru v $10^9/l$. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.



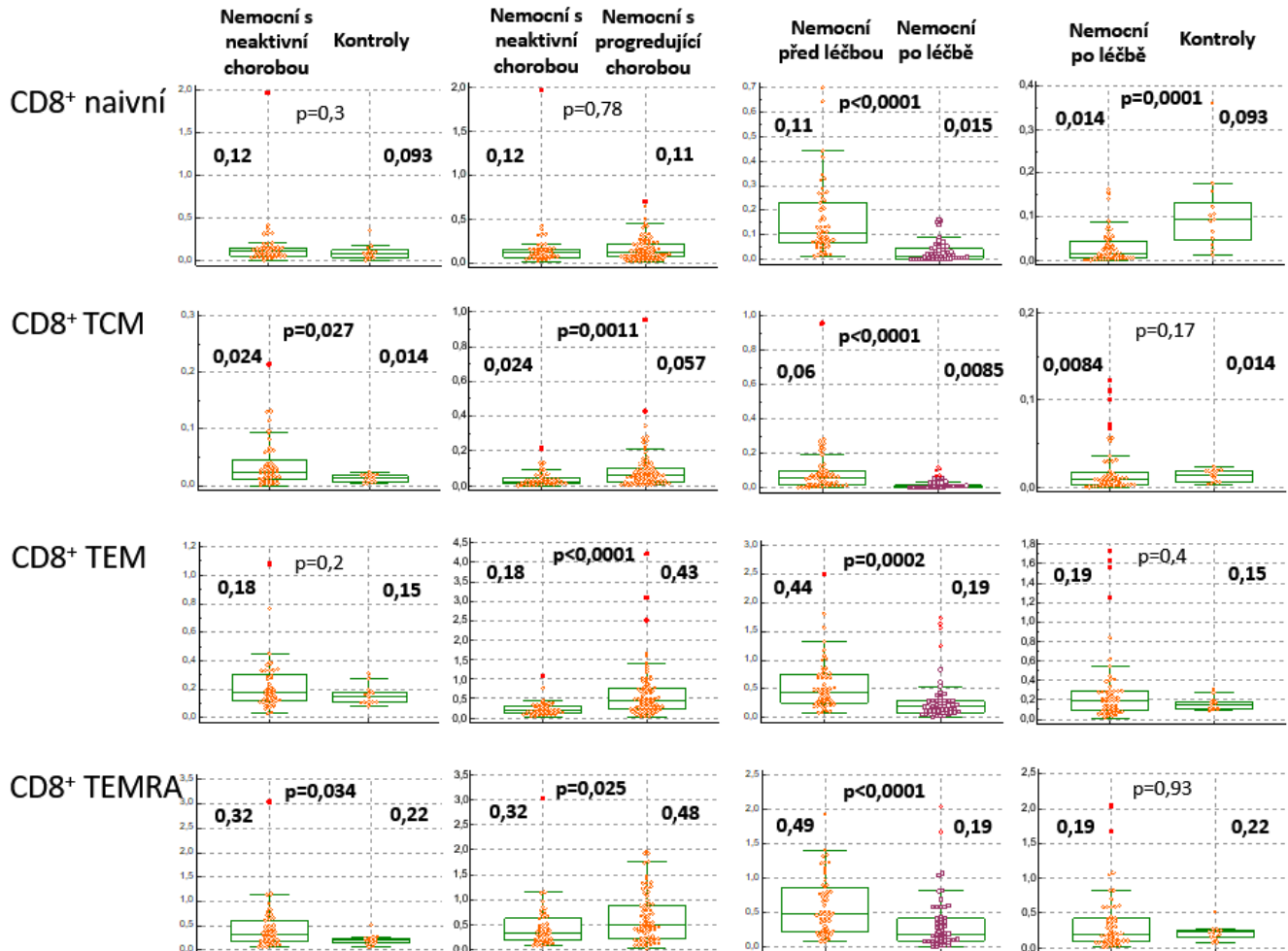
Obrázek 8. Krabicové grafy ukazující změny absolutních počtů dalších buněčných populací při progresi a po léčbě. Počty buněk jsou vyjádřeny jako mediány souboru v $10^9/l$. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.



Obrázek 9. Krabicové grafy ukazující změny absolutních počtů CD4⁺ subpopulací při progresi a po léčbě. Počty buněk jsou vyjádřeny jako mediány souboru v 10⁹/l. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.



Obrázek 10. Krabicové grafy ukazující změny absolutních počtů CD8⁺ subpopulací při progresi a po léčbě. Počty buněk jsou vyjádřeny jako mediány souboru v 10⁹/l. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.



7.2.4. Srovnání vlivu různých léčebných režimů na buněčné populace

Opět byly samostatně analyzovány párové vzorky nemocných léčených FCR (n=17), BR (n=18) a režimy s chlorambucilem (n=20; 9x O-Clb a 11x R-Clb). Změny hlavních buněčných populací byly podobné, jako když byla celá kohorta analyzována dohromady. Ojedinelé rozdíly spočívaly pouze v míře statistické významnosti – při analýze jednotlivých režimů nebyly některé změny statisticky významné pravděpodobně v důsledku malého množství pacientů v jednotlivých souborech – kompletní výsledky těchto subanalýz zobrazují tabulky 17-19. V případě relativního počtu T-reg byl po léčbě BR pozorován statisticky významný vzestup, po FCR a O-Clb / R-Clb nebyly změny statisticky významné. Vzhledem k tomu, že absolutní počet T-reg poklesl po všech typech léčby, je tento rozdíl dán zřejmě důsledkem rozdílné míry poklesu počtu ostatních CD4⁺, kam se T-reg počítají.

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

Byla porovnáována také míra změn buněčných populací mezi jednotlivými režimy léčby – při této analýze byl nejdříve spočítán rozdíl (pokles nebo vzestup) absolutního počtu všech buněčných populací před léčbou a po léčbě zvlášť pro každého pacienta. Výsledky pak byly srovnány mezi sebou pomocí Mann-Whitneyova testu (FCR vs. BR, FCR vs. O-Clb / R-Clb, BR vs. O-Clb / R-Clb). Při tomto srovnání se efekt léčby na hlavní buněčné populace včetně T-reg mezi jednotlivými režimy nelišil, kromě většího poklesu polyklonálních B-ly po FCR a BR ve srovnání s O-Clb / R-Clb (medián poklesu o 0,053 x 10⁹/l po FCR, 0,096 x 10⁹/l po BR a 0,021 x 10⁹/l po O-Clb / R-Clb; FCR vs. BR p=0,13; FCR vs. O-Clb / R-Clb p=0,034; BR vs. O-Clb / R-Clb p= 0,0027).

Také ve vlivu na funkční subsety byl v této analýze mezi režimy pouze jeden statisticky významný rozdíl, a to větší pokles počtu CD4⁺ TEMRA po FCR ve srovnání s O-Clb / R-Clb (medián poklesu o 0,062 x 10⁹/l vs. 0,004 x 10⁹/l, p=0,0062). Mezi režimy FCR a BR a režimy BR a O-Clb / R-Clb nebyly statisticky významné rozdíly.

Tabulka 17. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými před a po léčbě FCR. Absolutní počty jsou vyjádřeny v 10⁹/l, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

Buněčná populace	nemocní před léčbou FCR		nemocní po léčbě FCR		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	4,16	2,06	0,8	74,95	0,0003	0,0004
CD4 ⁺ T-ly	2,68	1,36	0,37	24,75	<0,0001	0,0036
CD8 ⁺ T-ly	1,28	0,8	0,52	40,48	0,0042	0,0003
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,05	0,03	0	0,39	0,0077	0,0099
CD4 ⁻ CD8 ⁻ T-ly	0,17	0,08	0,01	0,38	0,0004	0,055
celkové B-ly	203,25	97,74	0	0,05	0,0003	0,0003
klonální B-ly	203,17	97,7	0	0	0,0003	0,0003
polyklonální B-ly	0,06	0,03	0	0	0,0004	0,058
NKT buňky	0,17	0,12	0,01	0,82	0,012	0,012
NK buňky	0,54	0,3	0,27	23,75	0,0005	0,0003
CD4 ⁺ naivní	0,38	19,28	0,0047	1,85	0,0004	0,0016
CD4 ⁺ TCM	0,44	18,42	0,032	11,14	0,0004	0,034
CD4 ⁺ TEM	1,25	50,85	0,24	71,62	0,0004	0,0014
CD4 ⁺ TEMRA	0,072	4,21	0,0053	1,63	0,0005	0,68
CD8 ⁺ naivní	0,12	10,5	0,011	2,51	0,0013	0,049
CD8 ⁺ TCM	0,049	4,0	0,0069	1,15	0,0072	0,044
CD8 ⁺ TEM	0,46	39,84	0,27	47,17	0,013	0,16
CD8 ⁺ TEMRA	0,49	42,75	0,19	41,18	0,017	0,68
T-reg	0,28	11,25	0,024	10,94	0,018	0,94

Tabulka 18. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými před a po léčbě BR. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

Buněčná populace	nemocní před léčbou BR		nemocní po léčbě BR		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	2,99	4,93	0,71	71,76	0,0004	0,0003
CD4 ⁺ T-ly	1,74	2,99	0,26	21,07	0,0002	0,0033
CD8 ⁺ T-ly	1,01	1,26	0,45	44,82	0,014	0,0002
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,03	0,035	0,01	0,41	0,0035	0,019
CD4 ⁺ CD8 ⁻ T-ly	0,15	0,18	0,015	1,47	0,0008	0,0003
celkové B-ly	75,77	93,82	0	0,005	0,0002	0,0002
klonální B-ly	75,54	93,87	0	0	0,0002	0,0003
polyklonální B-ly	0,09	0,13	0	0	0,0003	0,0023
NKT buňky	0,23	0,54	0,025	2,84	0,028	0,06
NK buňky	0,77	0,96	0,19	21,6	0,0029	0,0002
CD4 ⁺ naivní	0,33	18,34	0,0019	1,33	0,0002	0,0003
CD4 ⁺ TCM	0,44	27,83	0,038	17,61	0,0002	0,047
CD4 ⁺ TEM	0,77	45,77	0,2	77,04	0,0021	<0,0001
CD4 ⁺ TEMRA	0,042	2,14	0,0063	3,34	0,0033	0,33
CD8 ⁺ naivní	0,14	14,17	0,025	4,93	0,0012	0,035
CD8 ⁺ TCM	0,066	6,28	0,011	2,91	0,0033	0,1
CD8 ⁺ TEM	0,37	34,07	0,19	41,22	0,058	0,069
CD8 ⁺ TEMRA	0,45	40,84	0,15	45,77	0,07	0,38
T-reg	0,16	9,93	0,027	17,89	0,0051	0,013

Tabulka 19. Srovnání absolutních a relativních počtů buněčných populací mezi nemocnými před a po léčbě O-Clb / R-Clb. Absolutní počty jsou vyjádřeny v $10^9/l$, relativní počty v %. Jedná se o mediány a aritmetické průměry daných souborů dat, jak je popsáno výše v metodice. Aritmetické průměry jsou psány kurzívou. Statisticky významné p-hodnoty jsou tučně.

Buněčná populace	nemocní před léčbou O-Clb / R-Clb		nemocní po léčbě O-Clb / R-Clb		p-hodnota	
	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet	absolutní počet	relativní počet
celkové T-ly	3,83	2,89	1,11	77,14	0,0002	0,0001
CD4 ⁺ T-ly	1,97	1,6	0,58	34,5	0,0001	0,0001
CD8 ⁺ T-ly	1,53	0,95	0,59	35,83	0,0017	0,0001
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-ly	0,025	0,035	0,01	0,66	0,12	0,0002
CD4 ⁻ CD8 ⁻ T-ly	0,16	0,11	0,02	1,17	0,0015	0,0002
celkové B-ly	175,79	95,66	0	0,13	0,0001	0,0001
klonální B-ly	175,79	95,56	0	0,125	0,0001	0,0001
polyklonální B-ly	0,02	0,02	0	0	0,0076	0,13
NKT buňky	0,17	0,22	0,04	2,07	0,0051	0,0051
NK buňky	0,59	0,45	0,2	13,29	0,0038	0,0001
CD4 ⁺ naivní	0,23	12,17	0,059	5,94	0,0001	0,023
CD4 ⁺ TCM	0,44	23,75	0,072	16,25	0,0002	0,075
CD4 ⁺ TEM	1,2	58,77	0,41	69,62	0,0015	0,036
CD4 ⁺ TEMRA	0,032	1,62	0,018	3,73	0,16	0,025
CD8 ⁺ naivní	0,079	6,33	0,012	3,36	0,0001	0,0064
CD8 ⁺ TCM	0,06	4,13	0,006	1,28	0,0002	0,011
CD8 ⁺ TEM	0,71	41,55	0,18	44,97	0,023	0,21
CD8 ⁺ TEMRA	0,7	41,47	0,21	38,96	0,0025	0,37
T-reg	0,27	12,35	0,11	14,9	0,021	0,44

7.2.5. Souvislost počtů buněk a infekčních komplikací

Stejně jako v případě koncentrací Ig byly porovnávány také parametry buněčné imunity mezi nemocnými, kteří prodělali a neprodělali infekci v období 3 let před odběrem krve do studie. Co se týče pacientů s neaktivní chorobou, infekční komplikaci mělo v tomto období 22 ze 45. Typ infekčních komplikací je uveden v tabulce 8. Pacienti, kteří infekci prodělali, měli statisticky významně vyšší absolutní počet klonálních B-ly (medián 28,4 vs. 13,32 x $10^9/l$, p=0,043), vyšší relativní počet klonálních B-ly (medián 93,3 vs. 81,5 %, p=0,046), nižší relativní počet polyklonálních B-ly (medián 93,3 vs. 81,5 %, p=0,046), NK buněk (medián 1,48 vs. 3,1 %, p=0,046),

$p=0,049$) a $CD4^+$ T-ly (medián 3,2 vs. 9,29 %, $p=0,033$). Nemocní s infekcemi měli také nižší poměr $CD4^+$ buněk ke klonálním B-ly (medián 0,034 vs. 0,12, $p=0,039$) a NK buněk ke klonálním B-ly (medián 0,016 vs. 0,039, $p=0,04$).

Z nemocných s progredující chorobou jich prodělalo infekční komplikaci v období 3 let před odběrem krve do studie 29 z 86. Jednalo se o 46 infekčních epizod, kdy 8 pacientů mělo více než jednu infekci. Jak bylo uvedeno výše, soubor progredujících pacientů, u nichž byly vyšetřeny buněčné populace, se mírně lišil od souboru, kde byly vyšetřeny koncentrace Ig (3 nemocní ze všech zařazených neměli vyšetření Ig a jiní 4 vyšetření buněčných populací), proto se i zaznamenané infekční komplikace mírně liší od údajů v tabulce 8 – zde byly navíc 2 epizody bronchitidy a naopak o 3 epizody pneumonie a 1 epizodu herpes labialis méně. Jediné statisticky významné rozdíly mezi nemocnými s progredující chorobou s infekcemi a bez infekcí v anamnéze byly nižší zastoupení naivních $CD4^+$ T-ly (medián 11,99 vs. 18,71 %, $p=0,041$) a vyšší absolutní počet $CD8^+$ TEM (medián 0,54 vs. $0,36 \times 10^9/l$, $p=0,043$) u nemocných s infekcemi.

Stejně jako v případě koncentrací Ig, ani zde nebyly vzhledem k nízkému výskytu samostatně analyzovány závažné infekce (viz výše).

K vyloučení případného vlivu neutropenie byl posouzen i vliv absolutního počtu neutrofilů na frekvenci infekcí, ačkoliv k dispozici byly hodnoty z doby odběru vzorků do studie, a nikoliv z doby aktivní infekce. To samozřejmě hraje u neutrofilů, jejichž počet se dynamicky mění, zásadní roli. Dle očekávání nebyla nalezena souvislost (pacienti s neaktivní chorobou: s infekcemi – medián $4,81 \times 10^9/l$, bez infekcí – medián $3,99 \times 10^9/l$, $p=0,26$; pacienti s progredující chorobou: s infekcemi – medián $4,029 \times 10^9/l$, bez infekcí – medián $4,52 \times 10^9/l$, $p=0,89$).

7.2.6. Prognostický význam počtů buněk

K progresi k léčbě došlo během sledování u 12 ze 45 nemocných s neaktivní chorobou. TTFT, resp. přežití bez léčby ve třech letech bylo 79 %. Statisticky významná souvislost s TTFT byla nalezena u 5 parametrů buněčné imunity. Vyšší relativní počet naivních $CD4^+$ T-ly ($p=0,0026$) a naivních $CD8^+$ T-ly ($p=0,023$) byly asociovány s delším TTFT, zatímco vyšší absolutní počet $CD4^+$ TCM ($p=0,027$) a vyšší relativní ($p=0,0047$) i absolutní ($p=0,003$) počet $CD4^+$ TEM byly

spojeny s kratším TTFT. Při analýze těchto 5 parametrů v multivariantní analýze však statistickou významnost všechny ztratily.

Opět byla provedena také ROC analýza k určení nejlepších cut-off hodnot k rozdělení kohorty na skupiny s rozdílným TTFF dle uvedených statisticky významných parametrů. Porovnání přežití bez léčby takto vytvořených skupin ukazují obrázky 11-15.

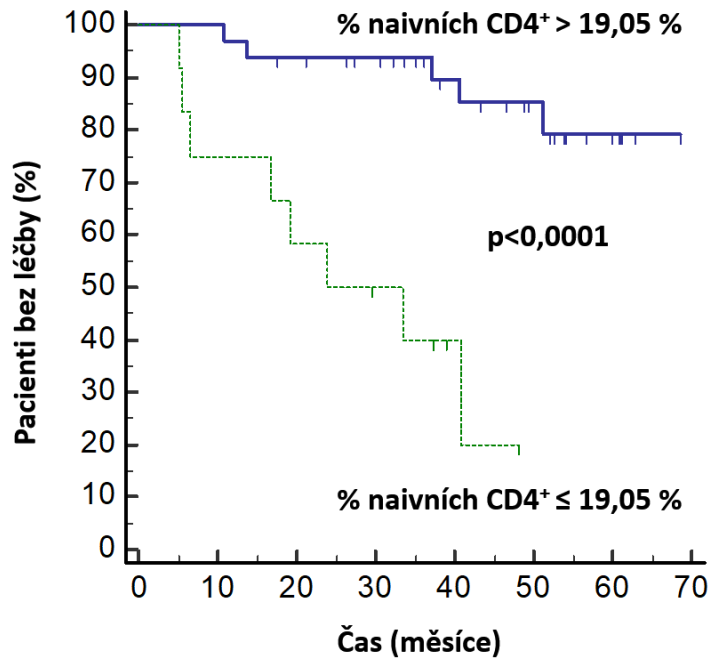
OS u nemocných s neaktivní chorobou nebylo analyzováno, protože v průběhu sledování zemřeli pouze 3 z nich.

Žádná souvislost nebyla nalezena mezi analyzovanými parametry a OS progredujících pacientů (v průběhu sledování zemřelo 17 z 86, OS ve třech letech bylo 79%).

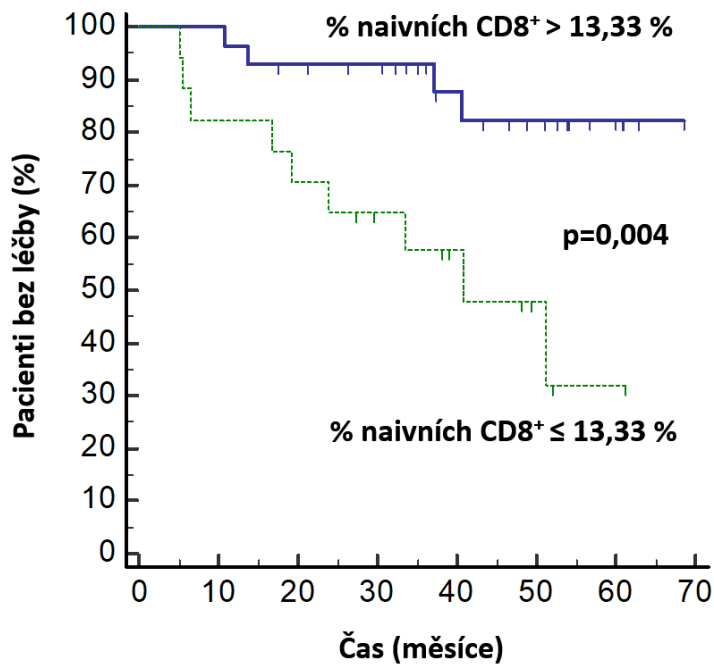
Dále byl zkoumán vliv buněčných populací na OS 56 nemocných léčených CHIT (18x FCR, 18x BR, 9x O-Clb, 11x R-Clb). V průběhu sledování zemřelo 7 z nich (3 nemocní léčení režimem BR a 4 nemocní léčení R-Clb). Statisticky významná souvislost s OS byla zjištěna pouze v případě absolutního počtu CD4⁺ TCM – vyšší počet byl spojen s kratším OS ($p=0,041$) – viz obrázek 16. V multivariantní analýze spolu s použitým léčebným režimem však tento parametr statistický význam ztratil. Ve stejné kohortě byl analyzován i TTNT. Podruhé bylo během sledování léčeno 20 nemocných, 4 předtím měli jako 1. linii léčby režim FCR, 6 BR, 4 O-Clb a 6 R-Clb. S kratším TTNT byl statisticky významně asociován vyšší absolutní počet T-reg ($p=0,042$) a vyšší absolutní počet CD4⁺ TCM ($p=0,035$) – viz obrázky 17 a 18. Počet CD4⁺ TCM zůstal významný i v multivariantní analýze, nezávisle na počtu T-reg, nebo použitým režimu CHIT ($p=0,024$, viz tabulka 20).

Vztah počtů buněk, OS a TTNT byl hodnocen také zvlášť pro jednotlivé režimy CHIT. Pouze v podskupině režimů s chlorambucilem byla nalezena souvislost mezi kratším TTNT na jedné straně a vyšším absolutním počtem naivních CD4⁺ T-ly ($p=0,018$), CD4⁺ TCM ($p=0,015$), naivních CD8⁺ T-ly ($p=0,016$) a CD8⁺ TCM ($p=0,0088$) na druhé straně. Žádný z těchto parametrů si ale nezachoval statistický význam, když byly analyzovány spolu v multivariantní analýze. V podskupinách s režimy FCR a BR nebyla mezi počty buněk, OS a TTNT zjištěna žádná souvislost.

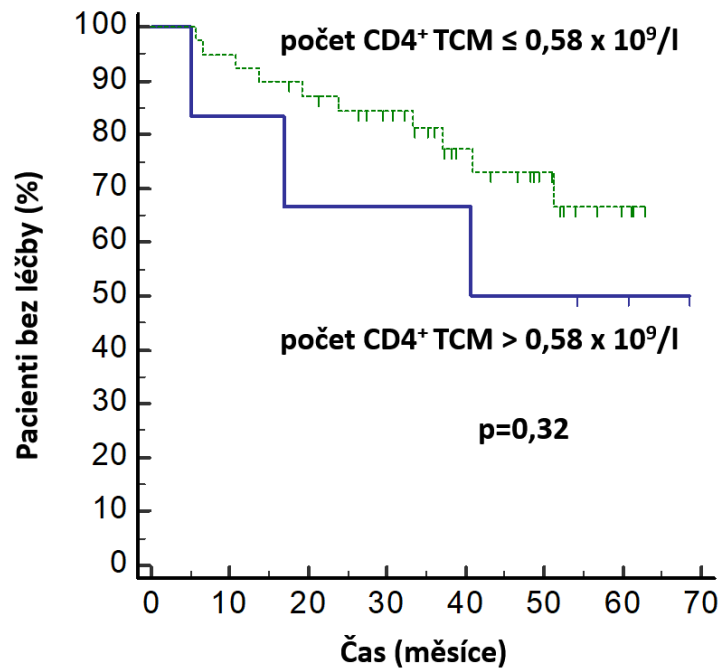
Obrázek 11. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s naivními CD4⁺ T-ly > 19,05 % a ≤ 19,05 %. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl (p<0,0001).



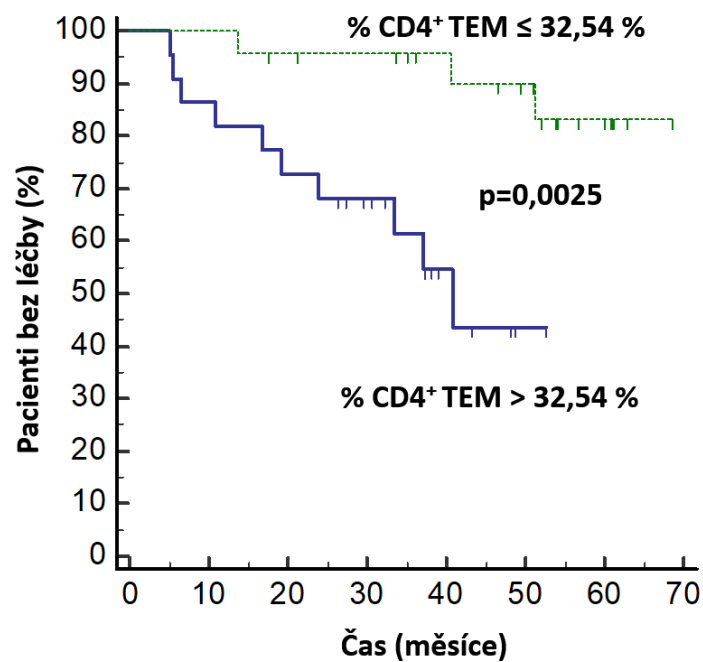
Obrázek 12. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s naivními CD8⁺ T-ly > 13,33 % a ≤ 13,33 %. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl (p=0,004).



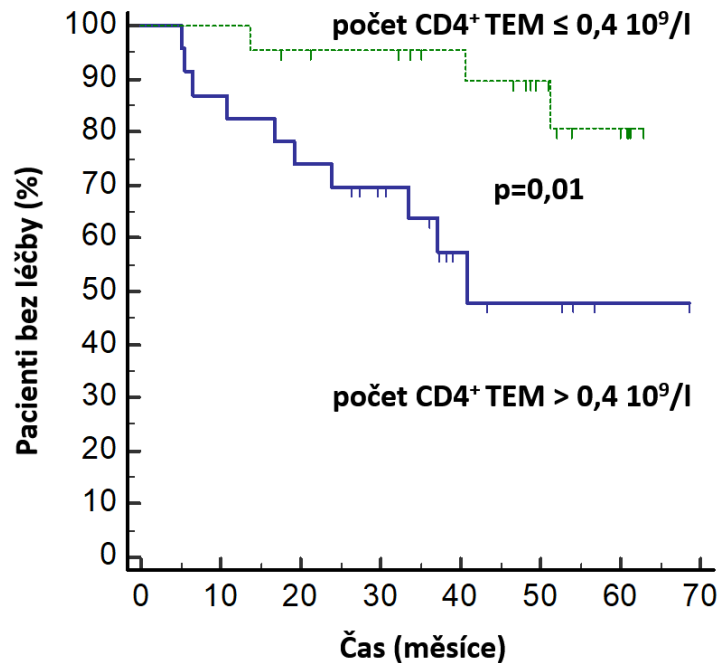
Obrázek 13. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s CD4⁺ TCM $\leq 0,58 \times 10^9/l$ a $> 0,58 \times 10^9/l$. Přesto, že v univariální analýze za použití Coxova modelu byl tento parametr statisticky signifikantní, pomocí ROC analýzy se nepodařilo rozdělit nemocné na 2 skupiny s rozdílným TTFT.



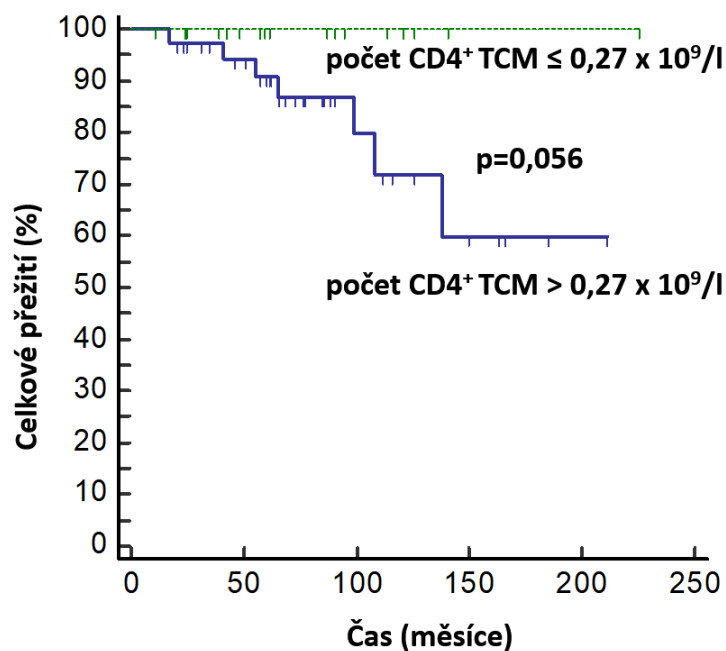
Obrázek 14. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s CD4⁺ TEM $\leq 32,54 \%$ a $> 32,54 \%$. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl ($p=0,0025$).



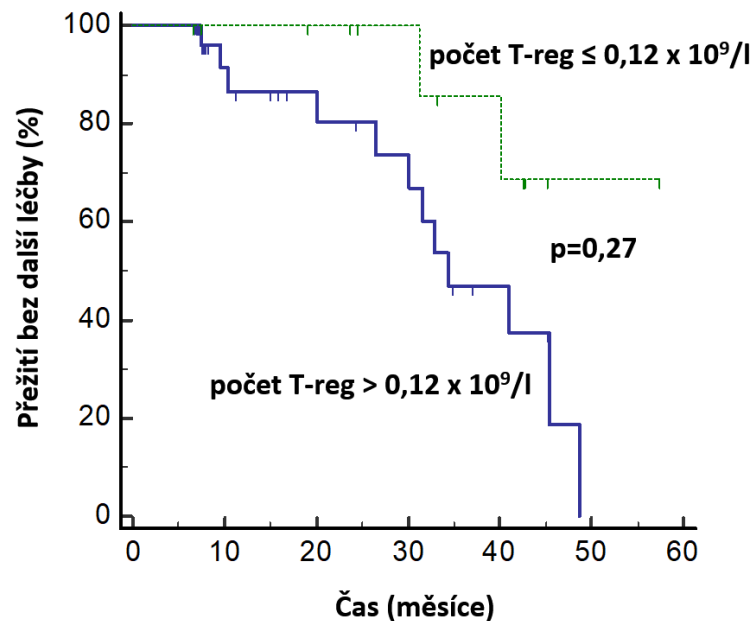
Obrázek 15. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTFT nemocných s neaktivní chorobou s $CD4^+$ TEM $\leq 0,4 \times 10^9/l$ a $> 0,4 \times 10^9/l$. Při srovnání log-rank testem je patrný statisticky významný rozdíl ($p=0,01$).



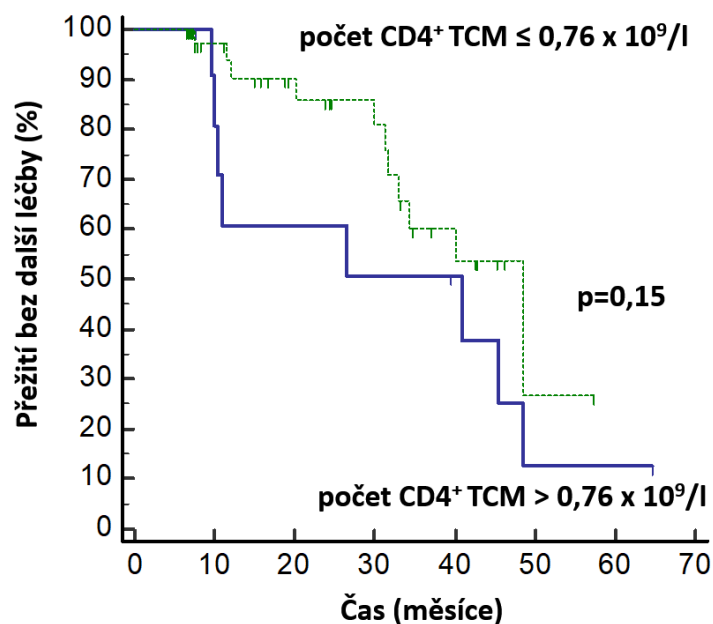
Obrázek 16. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující OS léčených nemocných s $CD4^+$ TCM $\leq 0,27 \times 10^9/l$ a $> 0,27 \times 10^9/l$. Při srovnání log-rank testem je mezi skupinami rozdělenými na základě ROC analýzy trend k delšímu přežívání u nemocných s nižším počtem $CD4^+$ TCM ($p=0,056$).



Obrázek 17. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTNT léčených nemocných s T-reg $\leq 0,12 \times 10^9/l$ a $> 0,12 \times 10^9/l$. Přesto, že v univariantní analýze za použití Coxova modelu byl tento parametr statisticky signifikantní, pomocí ROC analýzy se nepodařilo rozdělit nemocné na 2 skupiny s rozdílným TTNT.



Obrázek 18. Kaplan-Meierovy křivky zobrazující TTNT léčených nemocných s $CD4^+$ TCM $\leq 0,76 \times 10^9/l$ a $> 0,76 \times 10^9/l$. Přesto, že v univariantní i multivariantní analýze za použití Coxova modelu byl tento parametr statisticky signifikantní, pomocí ROC analýzy se nepodařilo rozdělit nemocné na 2 skupiny s rozdílným TTNT.



Tabulka 20. Multivariantní analýza asociace počtů buněčných populací a TTNT nemocných léčených CHIT (zařazeny parametry signifikantní v univariantní analýze a režimy léčby).

	poměr rizik	95% interval spolehlivosti	p-hodnota
počet CD4 ⁺ TCM	11,06	1,37 – 89,23	0,024
počet T-reg	0,37	0,045 – 3,02	0,35
FCR vs. BR	0,39	0,072 – 2,15	0,28
FCR vs. O-Clb	0,90	0,14 – 5,61	0,91
FCR vs. R-Clb	1,75	0,31 – 9,97	0,53

7.2.7. Souvislost počtů buněk a prognostických ukazatelů

Stejně jako v případě koncentrací Ig byly porovnány i absolutní a relativní počty zkoumaných buněk mezi nemocnými rozdělenými dle stádia dle Raie a přítomnosti nepříznivých prognostických ukazatelů. V kohortě nemocných s neaktivní chorobou měli pacienti s nemutovanými IGHV vyšší absolutní počet CD8⁺ T-ly (medián 1,08 vs. 0,62 x 10⁹/l, p=0,024). Dále byl u nich pozorován nižší relativní počet naivních CD4⁺ T-ly (průměr 21,99 vs. 39,21 %, p=0,011), a naopak vyšší relativní počet CD4⁺ TEM (průměr 52,42 vs. 32,53 %, p=0,0018), vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM (průměr 0,81 vs. 0,41 x 10⁹/l, p=0,0005) a CD8⁺ TEMRA (medián 0,62 vs. 0,26 x 10⁹/l, p=0,018) a trend k vyššímu absolutnímu počtu T-reg (průměr 0,15 vs. 0,089 x 10⁹/l, p=0,067). Další nepříznivé prognostické ukazatele nebyly u nemocných s neaktivní chorobou analyzovány (jen 2 z nich měli del 11q a jiní 2 stádium III-IV dle Raie).

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

Pacienti s progredující chorobou a mutací *TP53* měli vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM (medián 1,58 vs. 0,91 x 10⁹/l, p=0,046) a trend k vyššímu absolutnímu počtu T-reg (medián 0,27 vs. 0,17 x 10⁹/l, p=0,058). Když byly porovnány skupiny s, nebo bez del 17p, a s, nebo bez del 17p / mutace *TP53*, statisticky významné rozdíly nebyly zjištěny. Při porovnání skupin dle přítomnosti del 17p a / nebo del 11q měli pacienti s těmito chromozomálními aberacemi obecně vyšší absolutní i relativní počty celkových a klonálních B-ly a na základě toho nižší relativní počet celkových T-ly a CD8⁺ T-ly (celkové B-ly, relativní: medián 97,23 vs. 94,11 %, p=0,0494; celkové B-ly, absolutní: medián 205,79 vs. 77,64 x 10⁹/l, p=0,024; klonální B-ly,

relativní: medián 97,22 vs. 94,1 %, $p=0,053$; klonální B-ly, absolutní: medián 205,75 vs. 77,53 $\times 10^9/l$, $p=0,024$; celkové T-ly, relativní: medián 2,5 vs. 4,31 %, $p=0,07$; CD8⁺ T-ly, relativní: 0,75 vs. 1,39 %, $p=0,025$). Nemocní s del 17p a / nebo del 11q měli také trend k vyššímu absolutnímu počtu CD4⁺ T-ly (medián 2,36 vs. 1,81 $\times 10^9/l$, $p=0,063$) a polyklonálních B-ly (medián 0,087 vs. 0,059 $\times 10^9/l$, $p=0,051$). Co se týče funkčních subpopulací, měli pacienti s uvedenými delecemi vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM (medián 1,15 vs. 0,8 $\times 10^9/l$, $p=0,037$) a trend k vyššímu počtu CD4⁺ TEMRA (medián 0,056 vs. 0,04 $\times 10^9/l$, $p=0,056$).

Nejvíce rozdílů bylo zjištěno, když byli pacienti s progredující chorobou rozděleni na základě stádia dle Raie (III-IV vs. 0-II). Ti s pokročilejší chorobou měli podobně jako u předchozího srovnání vyšší absolutní i relativní počty celkových a klonálních B-ly a na základě toho nižší relativní počty všech ostatních hlavních buněčných populací (celkové B-ly, relativní: medián 97,0 vs. 91,01 %, $p=0,0001$; celkové B-ly, absolutní: medián 200,21 vs. 39,81 $\times 10^9/l$, $p=0,0002$; klonální B-ly, relativní: medián 97,00 vs. 91,13 %, $p=0,0002$; klonální B-ly, absolutní: medián 199,97 vs. 39,72 $\times 10^9/l$, $p=0,0002$; celkové T-ly, relativní: medián 2,25 vs. 7,82 %, $p=0,0001$; CD4⁺ T-ly, relativní: 1,27 vs. 5,2 %, $p=0,0007$; CD8⁺ T-ly, relativní: 0,8 vs. 2,38 %, $p=0,0001$; CD4⁺CD8⁺ T-ly, relativní: 0,03 vs. 0,06 %, $p=0,0051$; CD4⁻CD8⁻ T-ly, relativní: 0,09 vs. 0,34 %, $p=0,0002$; polyklonální B-ly, relativní: 0,03 vs. 0,16 %, $p<0,0001$; NKT buňky, relativní: 0,12 vs. 0,27 %, $p=0,037$; NK buňky, relativní: 0,39 vs. 1,65 %, $p<0,0001$). Absolutní počty ostatních hlavních populací (jiných než celkových a klonálních B-ly) se nelišily, byl pouze trend k nižšímu počtu polyklonálních B-ly u nemocných s pokročilejší chorobou (medián 0,057 vs. 0,091 $\times 10^9/l$, $p=0,078$).

Řada rozdílů byla i mezi funkčními subpopulacemi nemocných rozdělených dle stádia choroby: Pacienti ve stádiu III-IV dle Raie měli vyšší relativní i absolutní počet naivních CD4⁺ T-ly, vyšší absolutní počet CD4⁺ TCM a trend k nižšímu relativnímu počtu CD4⁺ TEM (naivní CD4⁺, relativní: medián 16,61 vs. 14,8 %, $p=0,03$; naivní CD4⁺, absolutní: medián 0,36 vs. 0,17 $\times 10^9/l$, $p=0,0074$; CD4⁺ TCM, absolutní: medián 0,54 vs. 0,36 $\times 10^9/l$, $p=0,034$; CD4⁺ TEM, relativní: průměr 47,87 vs. 56,6 %, $p=0,071$). Pokročilejší choroba byla dále spojena s trendem k vyššímu absolutnímu počtu naivních CD8⁺ T-ly, s vyšším relativním i absolutním počtem CD8⁺ TCM a trendem k nižšímu zastoupení CD8⁺ TEMRA (naivní CD8⁺, absolutní: medián 0,13 vs. 0,081 $\times 10^9/l$, $p=0,054$; CD8⁺ TCM, relativní: medián 5,95 vs. 3,26 %, $p=0,008$; CD8⁺ TCM, absolutní:

medián 0,063 vs. 0,026 x 10⁹/l, p=0,008; CD8⁺ TEMRA, relativní: průměr 38,92 vs. 46,34 %, p=0,063).

8. Diskuze

8.1. Sérové koncentrace imunoglobulinů

8.1.1. Koncentrace imunoglobulinů jsou nižší u nemocných s progredující CLL

Prevalence hypogamaglobulinémie u pacientů s neléčenou CLL je udávána v rozmezí 9,9-34,7 % pro IgG, 12-29,5 % pro IgA a 14,8-54 % pro IgM (37-45). Naše výsledky u nemocných s neaktivní chorobou spadají do tohoto rozmezí (25 % pro IgG, 22 % pro IgA a 29 % pro IgM), zatímco u pacientů s progredující CLL byl zjištěn výrazně vyšší výskyt v případě IgG (55 %) a IgA (63%). Deficit IgM mělo 55% progredujících nemocných, což je stále více, než udává většina studií zabývajících se touto problematikou. Většina publikovaných dat je o nemocných vyšetřených v době diagnózy, a tedy pravděpodobně s neaktivní chorobou (ačkoliv to často není specifikováno), čímž lze vysvětlit rozdíl od našich progredujících pacientů. Ve studiích Mauro a Parikha se prevalence hypogamaglobulinémie zvyšovala v průběhu sledování (37, 38). V naší práci nebyla opakovaná měření prováděna (zejména kvůli neochotě nemocných předaných k dalšímu sledování do spádových zařízení dojíždět pouze za účelem výzkumných odběrů). Srovnali jsme ale koncentrace Ig nemocných s neaktivní chorobou a nemocných indikovaných k léčbě. Druhá skupina měla statisticky významně nižší koncentrace všech tříd i podtříd Ig, což lze interpretovat jako důsledek progresu onemocnění. Nejedná se o překvapivý nález, nicméně pokud je nám známo, žádné podobné srovnání nebylo dosud publikováno.

8.1.2. Po léčbě včetně CHIT může docházet k vzestupu koncentrací IgA

Studií zabývajících se změnami koncentrací Ig po CHIT je velmi málo. Byl publikován vzestup IgG a IgM po léčbě fludarabinem event. v kombinaci s prednisonem a naopak pokles IgG po léčbě FCR (66, 67). U nemocných s lymfomy se pak v několika studiích prevalence hypogamaglobulinémie buď zvyšovala, nebo se hodnoty Ig významně neměnily (68, 69). Pokles Ig byl popsán také po léčbě BR, event. po bendamustinu s obinutuzumabem ve studiích GAUDI a GALLIUM (70, 71). Ačkoliv je tedy dat specificky pro CLL minimum, obecně se předpokládá, že CHIT může vést k prohloubení hypogamaglobulinémie.

Velká pozornost je v tomto směru v současnosti věnována cílené terapii. Po léčbě ibrutinibem byl již v několika studiích popsán vzestup IgA a s tím potenciálně související pokles výskytu infekcí (73-78).

V naší analýze byl zaznamenán statisticky významný vzestup IgA po podání CHIT (medián koncentrací IgA stoupl z 0,59 g/l na 0,74 g/l, $p=0,0031$). U ostatních tříd a podtříd nedošlo ke

statisticky významným změnám. Při samostatné analýze vlivu jednotlivých léčebných režimů byl vzestup Ig pozorován pouze po FCR (konkrétně vzestup IgA, IgA1 a IgG2), zatímco změny po režimu BR a chlorambucilových režimech nedosáhly statistické významnosti. To lze vyložit i tak, že vzestup IgA v celé kohortě léčených nemocných je zejména na vrub pacientů léčených FCR. Počty pacientů ve skupinách rozdělených podle režimu léčby byly ale již velmi nízké, takže výsledky musí být interpretovány s opatrností.

Možné vysvětlení vzestupu IgA po podání CHIT spočívá v celkovém zlepšení imunitních funkcí po potlačení CLL klonu, který je za hypogamaglobulinémií a další imunitní defekty přímo či nepřímo zodpovědný (cytotoxický vliv samotných CLL buněk, nebo autologních NK buněk na plazmocytu, deficit neklonálních B-ly, defekty T-ly) (46-48). Ačkoliv po ibrutinibu byl vzestup IgA popsán opakovaně, ani zde není mechanismus jasný. Jako jedna z možností se jeví zvýšená dostupnost růstových faktorů pro neklonální B-ly a tedy vzestup jejich počtu po eliminaci CLL buněk, dále lepší spolupráce B-ly s CD4⁺ T-ly v důsledku změn T-ly po ibrutinibu (viz kapitola 4.3.1.), nebo i specificky posun od Th2 zpět k Th1 imunitní odpovědi v důsledku působení ibrutinibu (75, 138, 141). Ačkoliv Th1 imunitní odpověď je založená spíše než na produkci protilátek na cytotoxických T-ly, bylo prokázáno, že tento posun koreluje se vzestupem koncentrace IgA u ibrutinibem léčených pacientů (141). Je možné, že některé popsané změny nejsou specifické pro ibrutinib, ale mohou být vyvolány jakoukoliv léčbou s kapacitou eliminovat CLL klon. Zároveň je však nutno zmínit jeden ze souvisejících výsledků druhé části naší studie; po léčbě CHIT došlo nikoliv ke vzestupu, ale k poklesu jak absolutního, tak relativního počtu polyklonálních B-ly. Jediné 2 studie, které přímo porovnávaly vliv CHIT a ibrutinibu na imunitní systém, jsou práce Solmana a Schliffkeho (138, 204). Solman et al. porovnávali důsledky léčby ibrutinibem a chlorambucilem. Zatímco ibrutinib způsobil pokles celkových T-ly, TEM a T-reg, ale ušetřil NK buňky a naivní T-ly, chlorambucil vedl k více méně uniformnímu poklesu všech buněčných populací. Ibrutinib navíc obnovil schopnost proliferace, sekrece cytokinů a degranulace T-ly a snížil expresi PD-1 na T-ly a apoptózu i neapoptotickou smrt T-ly po aktivaci (138). Schliffke et al. zkoumali změny repertoáru neklonálních B-ly u pacientů léčených ibrutinibem a FCR (204). Pokles počtu polyklonálních B-ly po ibrutinibu byl dokonce větší, než po FCR, ale mezi zbylými B-ly po léčbě se vyskytovali jak naivní B-ly (s nemutovanými IGHV), tak B-ly, které již prošly kontaktem s antigenem a somatickou hypermutací, a poměr těchto populací se v důsledku léčby nezměnil. Naproti

tomu většina B-ly, které zůstaly po léčbě FCR, byly nové, naivní. To může být zásadní pro schopnost rozvoje sekundární imunitní odpovědi a může to mít vliv i na koncentrace Ig (ačkoliv ty samotné nebyly v této práci analyzovány).

K zodpovězení otázky, co stojí za vzestupem IgA po léčbě ibrutinibem a jak ukazuje naše práce i po CHIT, je zjevně potřeba dalších výzkumů.

8.1.3. Souvislost mezi hypogamaglobulinémií, infekcemi a prognózou nemocných

Jedním z cílů práce bylo prozkoumat případnou souvislost mezi koncentracemi Ig a frekvencí infekcí. Jak ukazuje tabulka 1, řada předchozích studií tuto souvislost našla (37, 45, 51-54). V našem souboru nemocných jsme ji však nepozorovali. Vysvětlením může být samozřejmě poměrně malý počet vyšetřených nemocných. Také Andersen et al. nenašli souvislost mezi koncentracemi Ig a výskytem infekcí při analýze dat 159 nemocných s CLL z roku 2016 (41). Když ale o dva roky později publikovali výsledky obdobného výzkumu s rozsáhlejším souborem 1204 pacientů, byla již patrná vyšší frekvence infekcí při deficitu IgA, IgG i IgM v univariantsní analýze a ve třídě IgA i v multivariantsní analýze (45).

Na rozdíl od souvislosti s výskytem infekcí jsme v našem zkoumaném souboru prokázali souvislost mezi kratším OS a nižší koncentrací Ig, konkrétně IgG2 nemocných s progredující chorobou. Jen těsně pak nedosáhla statistické významnosti souvislost mezi nižší koncentrací IgA2 a kratším TTFT nemocných s neaktivní chorobou. Asociace nízkých koncentrací Ig s kratším OS byla pozorována v řadě dalších studií, nejčastěji pro IgA (40-43). Méně často pak pro IgG, nebo IgM (40, 41, 49). Asociace s kratším TTFT byla v jedné studii popsána pro IgG a ve dvou pro IgA (38, 43, 50). Stejně tak byla prokázána souvislost deficitu IgA s kratším TFS (37, 42). Podobně jako v případě infekcí je tedy nejvíce důkazů pro prognostický význam IgA. Jakým způsobem však souvisí deficit IgA a např. rychlejší progresse k léčbě je nejasné. Stejně tak je otázkou, zda k častým infekcím predisponují samotné nízké IgA, nebo jestli je koncentrace IgA jen dobrým odrazem hloubky imunodeficitu a hlavním viníkem infekcí jsou jiné defekty imunity.

8.1.4. Souvislost koncentrací imunoglobulinů a prognostických ukazatelů

Byla zkoumána souvislost koncentrací Ig a nejdůležitějších prognostických faktorů – stádia dle Raie, mutačního stavu IGHV, mutace *TP53*, del 11q a del 17p. Podobné analýzy jsou v literatuře ojedinělé. Byly popsány snížené koncentrace IgG (Parikh et al.), IgG a IgA (Ishdorj et al.),

respektive jakékoliv třídy Ig (Singh et al.) u nemocných ve vyšších stádiích dle Raie (38, 39, 43). V našem souboru neměli nemocní s progredující chorobou ve stádiu Rai 0-II statisticky významně rozdílné koncentrace Ig ve srovnání s nemocnými ve stádiu III-IV. Nabízí se následující vysvětlení: na rozdíl od citovaných prací jsme pacienty rozdělili na skupinu s neaktivní a progredující chorobou a analýzy jsme prováděli v rámci těchto skupin. Mezi nemocnými s neaktivní chorobou měli všichni kromě dvou časná stadia choroby a tato subanalýza zde tedy nebyla provedena. V rámci pacientů s progredující chorobou lze konstatovat, že i když část měla stádium I či II dle Raie, i u nich byla přítomna nějaká indikace k léčbě, např. masivní lymfadenopatie, a tedy choroba nejspíše podobně aktivní, jako u těch ve stádiu III či IV. Skutečně, když jsme zkusili analyzovat vliv stadia dle Raie u všech pacientů dohromady (s progredující i neaktivní chorobou), s výjimkou IgG1 a IgG3 měli pacienti ve vyšších stádiích nižší koncentrace všech tříd a podtříd Ig. Tuto analýzu však neuvádíme a místo toho předkládáme srovnání pacientů s neaktivní a progredující chorobou mezi sebou. Takové porovnání je v rámci publikované literatury unikátní a zároveň je rozdělení dle indikace k léčbě i "ostřejší," protože se naše skupiny (neaktivní a progredující) liší ve všech třídách a podtřídách Ig včetně IgG1 a IgG3.

Překvapivým zjištěním v našem výzkumu jsou vyšší koncentrace některých tříd a podtříd Ig u progredujících nemocných s nepříznivými prognostickými faktory. Pacienti s nemutovanými IGHV měli vyšší koncentrace IgG, IgG1 a IgM, pacienti s mutací *TP53*, a / nebo del 17p vyšší koncentrace IgA a IgA1 a ti s del 17p a / nebo del 11q vyšší koncentrace IgG, IgG1, IgG3 a IgM. Možným vysvětlením je, že hypogamaglobulinémie nemusí být přímo spojená s agresivitou choroby, ale spíše s délkou jejího trvání. CLL s nepříznivými biologickými rysy progreduje mnohem rychleji a některé změny v imunitním systému včetně hypogamaglobulinémie mohou k plnému rozvinutí potřebovat delší čas. Mauro et al. ani Parikh et al. nepozorovali žádnou souvislost koncentrací Ig s mutačním stavem IGHV, ale ve studii Ishdorja et al. měli nemocní s mutovanými IGHV nižší koncentrace IgM, což odpovídá našim zjištěním (37, 38, 43). Co se týče souvislosti s chromozomálními aberacemi, pouze Parikh et al. popsali nižší IgG u nemocných s tri 12 (nevýšetřovali ale jiné třídy či podtřídy Ig) (38). Mauro et al. neprokázali souvislost s del 11q či del 17p (37). Pokud je nám známo, naše práce je jediná, která zkoumala možný vliv dysfunkce *TP53* na hypogamaglobulinémii. Z výše citovaných studií nebyly informace o mutaci *TP53* k dispozici v žádné z nich a pouze ve dvou byly zahrnuty výsledky

FISH vyšetření del 17p. K potvrzení našich výsledků je třeba dalších studií s větším počtem pacientů.

8.2. Buněčné populace

8.2.1. Poměry zastoupení buněčných populací a jejich prognostický význam

Ve studiích Nunes et al. a Wua et al. byla inverze poměru CD4⁺ k CD8⁺ T-ly spojena s kratším TTFT, PFS i OS (87, 92). V naší analýze neměl tento poměr statisticky významný vliv na TTFT pacientů s neaktivní chorobou, ani TTNT, nebo OS pacientů s progredující chorobou. Tento rozdíl se dá alespoň částečně přičíst na vrub odlišnostem ve studovaných populacích. V naší studii mělo inverzi fyziologického CD4⁺ : CD8⁺ poměru pouze 9 / 45 (20 %) nemocných s neaktivní chorobou a 13 / 86 (15 %) nemocných s progredující chorobou, ve srovnání s 47 % ve studii Nunes et al.. Wu et al. zase analyzovali pacienty s neaktivní i progredující CLL dohromady.

Palmer et al. zjistili, že nižší poměr celkových T-ly a také NK buněk ke klonálním B-ly je u nemocných s nově dg. CLL (83 % bylo ve stádiu 0-I dle Raie) spojen s kratším TTFT (85). Tyto poměry přitom byly silnějším prediktorem rychlé progresy k léčbě, než prostý počet CLL buněk a zároveň samotné počty celkových T-ly či NK buněk nebyly s TTFT asociovány vůbec. Gonzalez-Rodriguez et al. pozorovali souvislost mezi nižším poměrem CD4⁺ i CD8⁺ T-ly ke klonálním B-ly a kratším OS (86). V naší práci jsme nepozorovali prognostický význam poměrů hlavních buněčných populací ke klonálním B-ly s jedinou výjimkou – pacienti s progredující chorobou a nižším poměrem NKT buněk k CLL buňkám měli statisticky významně kratší OS ($p=0,043$). Prognostický význam NKT buněk dosud popsali pouze v jedné studii, kde měli pacienti s neléčenou CLL a podílem NKT buněk z celkových T-ly > 5,3 % významně delší TFS a OS (205). Tyto, stejně jako naše výsledky naznačují, že NKT buňky mohou hrát významnou roli v kontrole maligního klonu.

8.2.2. Změny jednotlivých buněčných populací při progresi onemocnění

Při hodnocení dynamiky absolutních a relativních počtů hlavních buněčných populací byl v naší analýze patrný vzorec, kdy nemocní s neaktivní CLL měli vyšší absolutní počty většiny zkoumaných populací, než kontroly a progredující pacienti zase vyšší počty, než ti s neaktivní chorobou (s výjimkou CD4⁺CD8⁺ T-ly, polyklonálních B-ly, NKT a NK buněk). Tyto nálezy jsou kompatibilní s výše citovanými studiemi, kde měli nemocní počty CD4⁺ T-ly a CD8⁺ T-ly také zvýšené nad normu, nebo vyšší než kontroly.

Změny v poměrech mezi funkčními subpopulacemi byly nejpodrobněji popsány ve studii Nunes et al. a v případě CD8⁺ T-ly Richese et al. (87, 89). Pokud shrneme nálezy z obou studií, zdá se, že zatímco podíl naivních a TCM T-ly se snižuje, podíl TEM a TEMRa T-ly naopak stoupá, a to jak v CD4⁺, tak v CD8⁺ kompartmentu. V dalších studiích byla expanze CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEM a TEMRA spojena s pokročilou chorobou (93, 94). V práci Rissieka et al. byl vyšší podíl CD8⁺ TEM a TEMRA buněk spojen s kratším TTFT (206). V naší analýze byly největší rozdíly patrné mezi pacienty s progredující chorobou a kontrolami, zatímco nemocní s neaktivní chorobou a kontroly, nebo nemocní s progredující a neaktivní chorobou mezi sebou se lišili méně. V CD4⁺ kompartmentu progredujících nemocných jsme zaznamenali zvýšený absolutní počet TCM, TEM i TEMRA buněk, přičemž počet naivních CD4⁺ T-ly se nezměnil. Toto se ve smyslu % projevilo jako pokles podílu naivních CD4⁺ T-ly a vzestup CD4⁺ TEM, protože jejich absolutní počet se zvýšil nejvýrazněji. Podíl CD4⁺ TCM a TEMRA na celkových CD4⁺ T-ly zůstal podobný. V CD8⁺ kompartmentu jsou ve srovnání s CD4⁺ populací fyziologicky výrazně více zastoupeny TEMRA buňky. Dynamika změn mezi kontrolami, neaktivní a progredující CLL byla ale jinak obdobná té pozorované v CD4⁺ kompartmentu. Kromě počtů TCM buněk jsou uvedené nálezy srovnatelné s výsledky Nunes et al. Zatímco v její studii byl u pacientů ve srovnání s kontrolami popsán nižší relativní počet CD4⁺ TCM a obdobný trend u CD8⁺ TCM, my jsme naopak pozorovali ve srovnání s kontrolami vyšší podíl CD4⁺ TCM u nemocných s neaktivní chorobou a vyšší podíl CD8⁺ TCM u nemocných s progredující chorobou. Tuto odlišnost od dříve publikovaných výsledků lze částečně vysvětlit tím, že naše kontrolní skupina věkem zcela neodpovídala souboru vyšetřovaných nemocných (medián věku kontrol 60 let, pacientů s neaktivní chorobou 65 let, $p=0,0014$, pacientů s progredující chorobou 69 let, $p<0,0001$). Je známo, že podíl CD4⁺ TCM roste s věkem (90). To nicméně neplatí pro CD8⁺ TCM. Další příčinou rozdílných výsledků může být větší rozdíl v počtu TEM a TEMRA buněk u pacientů ve srovnání s kontrolami ve studii Nunes et al., než jsme pozorovali v našem souboru. Zmíněná studie bohužel neuvádí absolutní počty buněčných populací, takže se jedná pouze o spekulaci. Společným pozorováním naší i citované studie je však vzestup podílu diferencovanějších populací, zejména TEM a TEMRA, na úkor naivních T-ly. To může limitovat schopnost imunitního systému odpovídat na nové antigenní podněty včetně samotné CLL a tak přispívat k další progresi onemocnění.

8.2.3. Změny buněčných populací v důsledku léčby 1. linie

CHIT vedla k výraznému poklesu absolutních počtů buněk napříč populacemi. Počty buněk se tak vrátily na úroveň srovnatelnou s kontrolami, nebo i níže. V tomto směru tedy CHIT zvrátila efekt progresse onemocnění, tedy vzestup CD4⁺ T-ly, CD8⁺ T-ly, CD4⁻CD8⁻ T-ly, NK a NKT buněk. Míra poklesu byla orientačně nižší, než jaká byla publikována v podobných studiích, jde však pouze o nepřímé srovnání a předchozí studie se od naší i navzájem lišily detaily studovaných populací a metodikou (zejména různým časem odběru vzorku od ukončení léčby). Mediány absolutních počtů buněk po léčbě pro hlavní populace v naší studii byly 0,32 x 10⁹/l pro CD4⁺ T-ly, 0,52 x 10⁹/l pro CD8⁺ T-ly a 0,23 x 10⁹/l pro NK buňky, zatímco ostatní autoři udávají obvykle pokles pod 0,2 x 10⁹/l, zejména pro CD4⁺ T-ly.

Ačkoliv léčba vedla k redukci počtu všech typů buněk, míra poklesu byla variabilní. Výraznější pokles byl pozorován pro CD4⁺ T-ly, takže medián poměru CD4⁺ : CD8⁺ se odchýlil ještě více od fyziologických hodnot a v tomto směru tedy léčba spíše prohloubila inverzi tohoto poměru navozenou progresí CLL. Nemusí se však nutně jednat o negativní jev. Hlubší deplece CD4⁺ T-ly byla po léčbě FCR spojena s delším PFS u nemocných s detekovatelnou MRD (125). V další studii dosáhli pacienti s poklesem CD4⁺ T-ly pod 0,2 x 10⁹/l po 3 cyklech FCR častěji MRD negativitu (127). To lze vysvětlit mimo jiné i tak, že nižší pokles CD4⁺ T-ly po léčbě může být teoreticky pouze odrazem celkově nižší efektivity cytostatické léčby u daného jedince. Alternativně lze uvažovat o tom, že residuální CD4⁺ populace zahrnuje i T-reg, které podporují progresi onemocnění, takže její eradikace je žádoucí. Ve studii Beyera et al. měli pacienti po léčbě fludarabinem v rámci CD4⁺ populace nižší podíl T-reg, než pacienti po jiných typech léčby, nebo dosud neléčení (128). Časy odběrů vzorku od podání léčby byly ale v této studii mezi jednotlivými pacienty velmi variabilní a žádná další práce, která by zkoumala počty T-reg po podání CHIT *in vivo* nebyla od té doby publikována. V naší analýze jsme po podání CHIT pozorovali pokles absolutního počtu T-reg na úroveň srovnatelnou s kontrolami, avšak úbytek ostatních buněk v rámci CD4⁺ kompartmentu byl ještě větší, takže zastoupení T-reg v rámci všech CD4⁺ T-ly se naopak zvýšilo.

Efekt CHIT na absolutní počty funkčních subpopulací lymfocytů byl stejný, jako na hlavní buněčné populace, tj. pokles na úroveň zdravých kontrol, nebo dokonce i pod ni. Poměry počtu jednotlivých subpopulací se ale změnilo komplikovanějším způsobem. Podíl naivních T-ly, který byl nižší u pacientů s progredující chorobou, než u těch s neaktivní CLL a u kontrol,

poklesl ještě víc, zatímco podíl TEM buněk naopak ještě více vzrostl. Podíl TCM poklesl a podíl TEMRA se významně nezměnil. Tyto změny byly velmi obdobné pro CD4⁺ i CD8⁺ T-ly. Zastoupení subpopulací se tak po léčbě změnilo způsobem, který připomínal další progresi onemocnění, alespoň tedy pro naivní a TEM buňky. Literatura na toto téma je velmi omezená. Egle et al. a Gassner et al. pozorovali pokles relativního počtu naivních T-ly po léčbě fludarabinem, podobně jako my (127, 129). Zatímco v naší práci se snížil podíl TCM, ale vzrostl podíl TEM, v uvedených studiích tyto dva subsety nerozlišovali a popisují pouze zvýšení počtu paměťových buněk. Tyto studie se od naší práce lišily i metodikou, takže mírně odlišné výsledky lze očekávat (Gassner et al. zkoumali hlavně buňky vystavené působení CHIT *ex vivo* a lišily se i metody barvení pro průtokovou cytometrii). Naše analýza se však s citovanými studiemi shoduje v klíčovém závěru vzestupu relativního počtu více diferencovaných T-ly na úkor naivních buněk podobně, jako jsme pozorovali v důsledku progresu onemocnění (viz výše).

8.2.4. Srovnání vlivu různých léčebných režimů na buněčné populace

Při srovnání efektu jednotlivých léčebných režimů (FCR, BR, O-Clb a R-Clb) vyšlo najevo, že chlorambucilové režimy vedly k podobnému poklesu počtů buněk jako FCR a BR. Hlavním rozdílem ve srovnání s FCR / BR bylo, že pokles absolutního počtu CD4⁺ TEMRA po O-Clb / R-Clb nedosáhl statistického významu a v souladu s tím vzestup relativního počtu této populace po léčbě byl vyšší a statistického významu dosáhl. Příčina se ozřejmila poté, co jsme porovnali míru změn mezi jednotlivými typy léčby (tedy přírůstek nebo úbytek počtu buněk způsobený jednotlivými režimy – viz výše kapitola 7.2.4.). Rozdíl mezi počtem CD4⁺ TEMRA před a po léčbě u nemocných léčených O-Clb / R-Clb byl významně menší, než u pacientů léčených FCR. Jinak se FCR a chlorambucilové režimy v této analýze nelišily. Efekt režimu BR se překvapivě od FCR odlišoval o něco více, než efekt O-Clb / R-Clb. Změny ve smyslu vzestup / pokles počtu byly identické, nicméně změny navozené BR nedosáhly statistické významnosti v případě absolutního počtu CD8⁺ TEM a CD8⁺ TEMRA a relativního počtu CD8⁺ TCM.

Navzdory těmto vyjmenovaným rozdílům (podrobněji výše ve výsledcích) byly efekty všech tří typů léčby velmi podobné. To může být překvapivé, zvláště pro chlorambucilové režimy. Jejich vliv na buněčné populace byl dosud popsán pouze ve dvou studiích. Laszlo et al. pozorovali depleci CD4⁺ T-ly u 25 nemocných s indolentními lymfomy léčených chlorambucilem s rituximabem (137). Solman et al. porovnávali důsledky léčby ibrutinibem a chlorambucilem.

Zatímco ibrutinib způsobil pokles celkových T-ly, TEM a T-reg, ale ušetřil NK buňky a naivní T-ly, chlorambucil vedl k více méně uniformnímu poklesu všech buněčných populací (138). Zde předkládáme další data dokazující, že i chlorambucilové režimy mohou vést k lymfodepleci podobně, jako bendamustin, či fludarabin. Je však nezbytné zvážit i anti-CD20 monoklonální protilátku, jako možného viníka poklesu počtu T-ly. V analýze lymfocytárních populací u 52 nemocných s revmatoidní artritidou léčených monoterapií rituximabem mělo 50 % z nich pokles počtu CD4⁺ T-ly o 21-62% a dalších 25 % z nich pokles o 62-77% (207). Důvodem, proč po anti-CD20 léčbě dochází k depleci T-ly, může být ztráta cytokinů a antigen prezentující funkce, které jsou obojí poskytovány B-lymfocyty.

Zřejmou slabinou srovnání léčebných režimů v naší práci je samozřejmě nízký počet pacientů v jednotlivých podskupinách a kromě toho také rozdíly ve věku a množství komorbidit.

8.2.5. Souvislost počtů buněk a infekčních komplikací

Spojitost mezi populacemi lymfocytů a výskytem infekčních komplikací nebyla u CLL dosud podrobně studována. Většina dostupných informací se soustředí na souvislost s konkrétním typem léčby (přirozeně léčba vedoucí k další imunopresi zvyšuje frekvenci infekcí). Keating et al., ani Gauthier et al. nepozorovali souvislost mezi počtem CD4⁺ T-ly, CD8⁺ T-ly, nebo NK buněk a výskytem infekcí po léčbě fludarabinem (66, 125). Saito et al. zase nenašli spojitost mezi infekcemi a počtem CD4⁺ buněk u 56 nemocných s lymfomy léčenými režimem BR, nebo bendamustinem v monoterapii (133). Na druhou stranu v další studii s podstatně větším počtem pacientů bylo prokázáno, že nízký počet CD4⁺ T-ly v období 3 let po léčbě BR je rizikovým faktorem závažných infekcí (132).

V naší analýze jsme samostatně posuzovali nemocné s neaktivní a progredující chorobou. V první jmenované skupině byly infekce častější u nemocných s vyšším absolutním i relativním počtem klonálních B-ly, s nižším relativním počtem polyklonálních B-ly, NK buněk a CD4⁺ T-ly a také s nižším poměrem CD4⁺ T-ly a NK buněk ke klonálním B-ly. Všechny tyto výsledky ukazují spíše na význam velikosti nádorové nálože, než na význam absolutního počtu samotných CD4⁺ T-ly, nebo NK buněk, neboť ten se u nemocných s infekcemi i bez infekcí významně nelišil.

Zajímavější byly výsledky u nemocných s progredující chorobou. Pacienti s infekcemi měli nižší podíl naivních CD4⁺ T-ly a vyšší absolutní počet CD8⁺ TEM. Lze se domnívat, že relativní nedostatek naivních T-ly neumožňuje adekvátně reagovat na nové antigenní podněty a kromě

progrese CLL a event. rozvoje dalších malignit může také zvyšovat náchylnost nemocných k infekcím. Na druhou stranu nelze vyloučit ani možnost, že infekce jsou pouze častější u pacientů s pokročilejší chorobou, která je zároveň charakterizována relativní deplecí naivních T-ly a expanzí TEM, jak bylo demonstrováno výše. Infekce by pak mohly být důsledkem nikoliv změn lymfocytárních populací, ale jiných změn imunitního systému spojených s pokročilou chorobou.

8.2.6. Prognostický význam počtů buněk

Souvislost počtu T-reg s prognózou CLL je dobře známá. Řada studií popsala zvýšení absolutního či relativního počtu T-reg u nemocných s CLL ve srovnání s kontrolami, tak jak jsme ho pozorovali i my (97-101, 208-211). Stejně tak vyšší počet T-reg, který jsme zjistili u pacientů s progredující CLL ve srovnání s neaktivní, byl již dříve popsán (99, 100, 210). Ve studiích Weisse et al. a D'Areney et al. byl vyšší relativní, resp. absolutní počet T-reg spojen s kratším TTFT (101, 208). Dasgupta et al. pozorovali kratší TTFT i OS u pacientů s T-reg > 15,5 % ze všech CD4⁺ T-ly (209). V naší studii byl vyšší absolutní počet T-reg spojen s kratším TTNT nemocných, kteří podstoupili léčbu (p=0,042). V multivariantní analýze však počet T-reg pozbyl statistické významnosti. Kromě T-reg jsme u žádné další hlavní buněčné populace nepozorovali prognostický význam ve smyslu TTFT nemocných se stabilní chorobou, ani TTNT a OS nemocných s progredující chorobou. Vliv počtu NK buněk na OS udávaný ve studii Wanga et al. nebyl v naší práci potvrzen, potenciálně kvůli menšímu počtu pacientů (164).

Jak bylo zmíněno, relativní pokles naivních T-ly s expanzí více diferencovaných subsetů byl v naší studii pozorován při progresi onemocnění, dále ještě více po léčbě a také u nemocných s infekcemi. V neposlední řadě pak byl stejný jev spojen i s horší prognózou. Pacienti s neaktivní chorobou a nižším relativním počtem naivních CD4⁺ i CD8⁺ T-ly měli kratší TTFT. To dále podporuje naši teorii o roli naivních T-ly v kontrole maligního klonu. Pokud je nám známo, jedná se o dosud nepublikované nálezy. Další zjištění v kohortě pacientů s neaktivní chorobou, tj. asociace vyššího absolutního počtu CD4⁺ TCM a TEM a vyššího relativního počtu CD4⁺ TEM s kratším TTFT do tohoto konceptu zapadají a také nebyly dosud publikovány. Vyšší absolutní počet CD4⁺ TCM byl dále spojen s kratším OS a TTNT nemocných léčených CHIT, přičemž souvislost s TTNT zůstala signifikantní i v multivariantní analýze nezávisle na léčebném režimu. Souvislost mezi počty buněk (před léčbou) a OS / TTNT byla hodnocena také samostatně pro jednotlivé léčebné režimy. Ve skupině léčené O-Clb / R-Clb byly vyšší absolutní počty CD4⁺ i

CD8⁺ naivních i TCM buněk asociovány s kratším TTNT. Negativní prognostický význam vyšších absolutních počtů naivních T-ly může být překvapivý, ale není v přímém rozporu s výše uvedeným pozitivním vlivem vyšších relativních počtů těchto buněk. Jak ukazuje tabulka 13, absolutní počty naivních T-ly jsou podobné u kontrol i pacientů s neaktivní i progredující chorobou. Jejich relativní deplece při progresi choroby je tak spíše důsledkem vzestupu absolutního počtu ostatních subpopulací.

8.2.7. Vztah počtů buněk a prognostických ukazatelů

Informací na téma souvislosti známých prognostických ukazatelů se změnami počtů buněk je v literatuře ještě méně, než v případě koncentrací Ig. Brusa et al. popsali souvislost vyššího relativního počtu CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEMRA buněk se stádiem B / C dle Bineta, s nemutovanými IGHV, del 11q a del 17p (93). Jednalo se o smíšený soubor léčených i neléčených nemocných. V další studii měli nemocní s vyšším relativním počtem CD8⁺ TEM a také nižším relativním počtem CD8⁺ TCM častěji nemutované IGHV a pokročilejší chorobu (Binet B / C) (94).

V naší studii se u nemocných s neaktivní chorobou pojily nemutované IGHV s vyšším absolutním počtem CD8⁺ T-ly, nižším relativním počtem naivních CD4⁺ T-ly, vyšším relativním počtem CD4⁺ TEM, vyšším absolutním počtem CD4⁺ TEM a CD8⁺ TEMRA a s trendem k vyššímu absolutnímu počtu T-reg. U nemocných s progredující chorobou měli ti s nemutovanými IGHV vyšší relativní počet T-reg a trend k vyššímu relativnímu počtu CD8⁺ TEM. V obou skupinách se jedná o obdobné rozdíly, jaké byly pozorovány i při vzájemném porovnání mezi nemocnými s neaktivní a progredující chorobou, tj. i v rámci jedné z těchto skupin mají nemocní s nemutovanými IGHV změny spojené s progresí onemocnění. To není překvapivý závěr. Je však zajímavé, že situace je přesně opačná, než v případě koncentrací Ig, kde pacienti s nemutovanými IGHV měli vyšší koncentrace některých tříd a podtříd.

Překvapivé výsledky nepřinesla ani analýza souvislosti s dalšími prognostickými faktory (provedená jen u progredujících nemocných, protože u těch s neaktivní chorobou se nevyskytovaly). Pacienti s del 17p a / nebo del 11q měli vyšší absolutní i relativní počty celkových a klonálních B-ly a odpovídajícím způsobem snížené relativní počty celkových T-ly a CD8⁺ T-ly. Dále také vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM a trend k vyššímu počtu CD4⁺ TEMRA. Pacienti s mutací *TP53* měli vyšší absolutní počet CD4⁺ TEM a trend k vyššímu absolutnímu počtu T-reg. Ve všech případech jsou zde stejně jako u IGHV změny typické pro progresi onemocnění častější u skupiny s nepříznivými prognostickými faktory.

Jestliže tedy v případě koncentrací Ig bylo konstatováno, že hypogamaglobulinémie potřebuje k rozvoji především čas a u agresivní choroby s nepříznivými prognostickými rysy a rychlou progresí se zřejmě nestihne rozvinout, zde lze naopak říct, že změny buněčných populací jsou dynamičtější a dle očekávání u agresivnější choroby hlubší.

Posledním prognostickým faktorem, jehož souvislost s buněčnými populacemi byla zkoumána, bylo stádium dle Raie. Nemocní ve stádiu Rai III-IV měli ve srovnání s těmi ve stádiu Rai 0-II vyšší absolutní i relativní počty celkových a klonálních B-ly a z toho důvodu nižší relativní počty ostatních hlavních buněčných populací, přesto, že jejich absolutní počty se nelišily. To jednoduše odpovídá větší pokročilosti jejich choroby. Pacienti ve stádiu Rai III-IV měli ale také vyšší relativní i absolutní počet naivních CD4⁺ T-ly, vyšší absolutní počet CD4⁺ TCM, trend k nižšímu relativnímu počtu CD4⁺ TEM, vyšší absolutní počet naivních CD8⁺ T-ly, vyšší relativní i absolutní počet CD8⁺ TCM a trend k nižšímu relativnímu počtu CD8⁺ TEMRA.

Rozdíly ve funkčních subsetech mezi nemocnými rozdělenými dle stádia choroby se tedy výše uvedenému konceptu vymykají – pacienti s vyššími stádii dle Raie mají sice vyšší počty TCM buněk, což odpovídá progredující chorobě, ale zároveň i vyšší počty naivních buněk a nejsou zvýšeny TEM ani TEMRA. Zdůvodnění je zde problematické. Je jistě nutno připustit i možnost chyby malých čísel, nabízí se však také podobné vysvětlení jako u koncentrací Ig – všichni pacienti s progredující chorobou, které jsme takto analyzovali, byli indikováni k léčbě, i když z různých důvodů. I ti ve stádiu Rai I či II měli vysoce aktivní chorobu. Od srovnání skupin rozdělených podle stádia nelze tedy v takové situaci čekat stejné rozdíly, jako od srovnání nemocných s neaktivní a progredující chorobou, tedy jinak řečeno neindikovaných a indikovaných k léčbě. Proč měli v naší analýze pacienti indikovaní na základě organomegalie (Rai I-II) méně naivních T-ly, než pacienti indikovaní na základě cytopenie (Rai III-IV), zůstává nejasné. Je možné, že masivní lymfadenopatie je v mnoha případech spojena s větší nádorovou náloží a tedy aktivnější chorobou, než "pouhá" infiltrace kostní dřeně, nebo je zkrátka biologie choroby odlišná a vede k jinému spektru změn v subpopulacích T-ly. Zde už se ovšem pohybujeme v rovině spekulací a k objasnění těchto otázek nebyla naše analýza uzpůsobena.

9. Závěry

Bylo provedeno komplexní zhodnocení kvantit Ig a lymfocytárních populací u nemocných s neaktivní i progredující CLL. Byl zhodnocen vliv 1. linie léčby CHIT, prognostický význam vyšetřovaných parametrů i jejich možná souvislost se známými prognostickými faktory a výskytem infekčních komplikací.

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

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

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

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

Mezi slabiny předložené analýzy patří její unicentrické uspořádání a relativně malý počet pacientů, zejména v případě subanalýz jednotlivých léčebných režimů. Vzhledem k observačnímu charakteru studie nebyli samozřejmě nemocní mezi jednotlivé režimy

randomizováni. K potvrzení našich závěrů by bylo vhodné provést další studie s větším počtem nemocných.

10. Seznam použité literatury

1. Panovská A, Doubek M, Brychtová Y, Mayer J. Chronic lymphocytic leukemia and focusing on epidemiology and management in everyday hematologic practice: recent data from the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2010;10(4):297-300.
2. Dušek L, Krejčí D, Mužík J et al. Hematologické nádory: epidemiologie, klasifikace, predispozice. *Trans Hemat Dnes.* 2018;suppl 2:5-8.
3. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):524-548.
4. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975;46(2):219-234.
5. Salem DA, Stetler-Stevenson M. Clinical Flow-Cytometric Testing in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Methods Mol Biol.* 2019;2032:311-321.
6. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev.* 2009;23(1):25-47.
7. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1848-1854.
8. Fürstenau M, Tausch E, Schneider C et al. Venetoclax-based time-limited combinations in frontline CLL: primary endpoint and subgroup analyses from the phase 3 GAIA/CLL13 trial [poster]. In: *New Frontiers in CLL Research*, 6-8. října 2022
9. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26):1910-1916.
10. Döhner H, Fischer K, Bentz M et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood.* 1995;85(6):1580-1589.

11. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE et al. Ibrutinib Treatment for First-Line and Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Final Analysis of the Pivotal Phase Ib/II PCYC-1102 Study. *Clin Cancer Res.* 2020;26(15):3918-3927.
12. Munir T, Brown JR, O'Brien S et al. Final analysis from RESONATE: Up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol.* 2019;94(12):1353-1363.
13. Tausch E, Schneider C, Robrecht S et al. Prognostic and predictive impact of genetic markers in patients with CLL treated with obinutuzumab and venetoclax. *Blood.* 2020;135(26):2402-2412.
14. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981;48:198-206.
15. Dighiero G, Maloum K, Desablens B et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 1998;338(21):1506-1514.
16. Hoehstetter MA, Busch R, Eichhorst B et al. Early, risk-adapted treatment with fludarabine in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: results of the CLL1 trial of the German CLL study group. *Leukemia.* 2017;31(12):2833-2837.
17. Herling CD, Cymbalista F, Groß-Ophoff-Müller C et al. Early treatment with FCR versus watch and wait in patients with stage Binet A high-risk chronic lymphocytic leukemia (CLL): a randomized phase 3 trial. *Leukemia.* 2020;34(8):2038-2050.
18. Langerbeins P, Zhang C, Robrecht S et al. The CLL12 trial: ibrutinib vs placebo in treatment-naïve, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2022;139(2):177-187.
19. Smolej L, Špaček M, Pospíšilová Š et al. Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie (CLL) 2021. *Trans Hemat Dnes.* 2021;27(1):91-106.
20. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1164-1174.

21. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):928-942.
22. Goede V, Fischer K, Busch R et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2014;370(12):1101-1110.
23. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE et al. Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2019;381(5):432-443.
24. Burger JA, Barr PM, Robak T et al. Long-term efficacy and safety of first-line ibrutinib treatment for patients with CLL/SLL: 5 years of follow-up from the phase 3 RESONATE-2 study. *Leukemia.* 2020;34(3):787-798.
25. Sharman JP, Egyed M, Jurczak W et al. Acalabrutinib with or without obinutuzumab versus chlorambucil and obinutuzumab for treatment-naive chronic lymphocytic leukaemia (ELEVATE TN): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2020;395(10232):1278-1291.
26. Al-Sawaf O, Zhang C, Tandon M et al. Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(9):1188-1200.
27. Smolej L, Vodárek P, Écsiová D, Šimkovič M. Chemoimmunotherapy in the First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia: Dead Yet, or Alive and Kicking?. *Cancers (Basel).* 2021;13(13):3134.
28. Wierda WG, Brown J, Abramson JS et al. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 1.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. [online]. Last updated: 30/08/2022. [cit. 2023-10-23]. Dostupné z: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cll.pdf
29. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2021;32(1):23-33.

30. Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br Med Bull.* 2008;87:49-62.
31. Hamblin TJ. Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 2006;33(2):230-239.
32. Dasanu CA, Alexandrescu DT. Risk for second nonlymphoid neoplasms in chronic lymphocytic leukemia. *MedGenMed.* 2007;9(4):35.
33. Molica S. Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment. *Leuk Lymphoma.* 1994;13(3-4):203-214.
34. Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 2006;33(2):240-249.
35. Molica S, Levato D. What is changing in the natural history of chronic lymphocytic leukemia?. *Haematologica.* 2001;86(1):8-12.
36. Hudson RP, Wilson SJ. Hypogammaglobulinemia and chronic lymphatic leukemia. *Cancer.* 1960;13:200-204.
37. Mauro FR, Morabito F, Vincelli ID et al. Clinical relevance of hypogammaglobulinemia, clinical and biologic variables on the infection risk and outcome of patients with stage A chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2017;57: 65-71.
38. Parikh SA, Leis JF, Chaffee KG et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer.* 2015;121(17):2883-2891.
39. Singh N, Mott SL, Sutamtewagul G et al. Prevalence and the impact of hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic lymphoma patients. *EJHaem.* 2020;1(2):537-544.
40. Rozman C, Montserrat E, Viñolas N. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer.* 1988;61(2):279-283.
41. Andersen MA, Vojdeman FJ, Andersen MK et al. Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia is a predictor of early death. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(7):1592-1599.

42. Shvidel L, Tadmor T, Braester A et al. Serum immunoglobulin levels at diagnosis have no prognostic significance in stage A chronic lymphocytic leukemia: a study of 1113 cases from the Israeli CLL Study Group. *Eur J Haematol*. 2014;93(1):29-33.
43. Ishdorj G, Streu E, Lambert P, et al. IgA levels at diagnosis predict for infections, time to treatment, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Adv*. 2019;3(14):2188-2198.
44. Korona-Glowniak I, Grywalska E, Grzegorzczak A, Roliński J, Glowniak A, Malm A. Bacterial Colonization in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Factors Associated with Infections and Colonization. *J Clin Med*. 2019;8(6):861.
45. Andersen MA, Eriksen CT, Brieghel C et al. Incidence and predictors of infection among patients prior to treatment of chronic lymphocytic leukemia: a Danish nationwide cohort study. *Haematologica*. 2018;103(7):e300-e303.
46. Kay NE, Perri RT. Evidence that large granular lymphocytes from B-CLL patients with hypogammaglobulinemia down-regulate B-cell immunoglobulin synthesis. *Blood*. 1989;73(4):1016-1019.
47. Sampalo A, Navas G, Medina F, Segundo C, Cámara C, Brieva JA. Chronic lymphocytic leukemia B cells inhibit spontaneous Ig production by autologous bone marrow cells: role of CD95-CD95L interaction. *Blood*. 2000;96(9):3168-3174.
48. Criado I, Muñoz-Criado S, Rodríguez-Caballero A et al. Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Host virus and pneumococcus-specific immune responses in high-count monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia: implications for disease progression. *Haematologica*. 2017;102(7):1238-1246.
49. Crassini K.R., Zhang E., Balendran S. et al. Humoral immune failure defined by immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass deficiency is associated with shorter treatment-free and overall survival in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Br J Haematol*. 2018;181:97-101.
50. Corbingi A, Innocenti I, Tomasso A et al. Monoclonal gammopathy and serum immunoglobulin levels as prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2020;190(6):901-908.

51. Francis S, Karanth M, Pratt G et al. The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2006;107(5):1023-1033.
52. Visentin A, Compagno N, Cinetto F et al. Clinical profile associated with infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. Protective role of immunoglobulin replacement therapy. *Haematologica*. 2015;100(12):e515-e518.
53. Hensel M, Kornacker M, Yammeni S, Egerer G, Ho AD. Disease activity and pretreatment, rather than hypogammaglobulinaemia, are major risk factors for infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;122(4):600-606.
54. Freeman JA, Crassini KR, Best OG et al. Immunoglobulin G subclass deficiency and infection risk in 150 patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(1):99-104.
55. Nosari A. Infectious complications in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012070.
56. Pasiarski M, Rolinski J, Grywalska E et al. Antibody and plasmablast response to 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in chronic lymphocytic leukemia patients--preliminary report. *PLoS One*. 2014;9(12):e114966.
57. Svensson T, Kättström M, Hammarlund Y et al. Pneumococcal conjugate vaccine triggers a better immune response than pneumococcal polysaccharide vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia A randomized study by the swedish CLL group. *Vaccine*. 2018;36(25):3701-3707.
58. Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;1:450-456.
59. Sarris K, Maltezas D, Koulieris E et al. Prognostic significance of serum free light chains in chronic lymphocytic leukemia. *Adv Hematol*. 2013;2013:359071.

60. Tsai HT, Caporaso NE, Kyle RA et al. Evidence of serum immunoglobulin abnormalities up to 9.8 years before diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a prospective study. *Blood*. 2009;114(24):4928-4932.
61. Maurer MJ, Cerhan JR, Katzmann JA et al. Monoclonal and polyclonal serum free light chains and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(10):2821-2826.
62. Xu W, Wang YH, Fan L et al. Prognostic significance of serum immunoglobulin paraprotein in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2011;35(8):1060-1065.
63. Rizzo D, Chauzeix J, Trimoreau F et al. IgM peak independently predicts treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia and correlates with accumulation of adverse oncogenetic events. *Leukemia*. 2015;29(2):337-345.
64. Raanani P, Gafter-Gvili A, Paul M, Ben-Bassat I, Leibovici L, Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(5):764-772.
65. Reiser M, Borte M, Huscher D et al. Management of patients with malignancies and secondary immunodeficiencies treated with immunoglobulins in clinical practice: long-term data of the SIGNS study. *Eur J Haematol*. 2017;99(2):169-177.
66. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. 1998;92:1165-1171.
67. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23:4079-4088.
68. Casulo C, Maragulia J, Zelenetz AD. Incidence of hypogammaglobulinemia in patients receiving rituximab and the use of intravenous immunoglobulin for recurrent infections. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13:106-111.

69. Czuczman MS, Koryzna A, Mohr A et al. Rituximab in combination with fludarabine chemotherapy in lowgrade or follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:694-704.
70. Roberts DM, Jones RB, Smith RM et al. Rituximab-associated hypogammaglobulinemia: incidence, predictors and outcomes in patients with multi-system autoimmune disease. *J autoimmun*. 2015;57:60-65.
71. Hiddemann W, Barbui AM, Canales MA et al. Immunochemotherapy With Obinutuzumab or Rituximab for Previously Untreated Follicular Lymphoma in the GALLIUM Study: Influence of Chemotherapy on Efficacy and Safety. *J Clin Oncol*. 2018;36(23):2395-2404.
72. Grigg A, Dyer MJ, Díaz MG et al. Safety and efficacy of obinutuzumab with CHOP or bendamustine in previously untreated follicular lymphoma. *Haematologica*. 2017;102(4):765-772.
73. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(1):32-42.
74. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):48-58.
75. Sun C, Tian X, Lee YS et al. Partial reconstitution of humoral immunity and fewer infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Blood*. 2015;126(19):2213-2219.
76. Barrientos JC, O'Brien S, Brown JR et al. Improvement in Parameters of Hematologic and Immunologic Function and Patient Well-being in the Phase III RESONATE Study of Ibrutinib Versus Ofatumumab in Patients With Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(12):803-813.
77. Cassin R, Visentin A, Giannarelli D et al. Increase of immunoglobulin A during ibrutinib therapy reduces infection rate in chronic lymphocytic leukemia patients. *Hematol Oncol*. 2021;39(1):141-144.

78. Burger JA, Sivina M, Jain N et al. Randomized trial of ibrutinib vs ibrutinib plus rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2019;133(10):1011-1019.
79. Byrd JC, Woyach JA, Furman RR et al. Acalabrutinib in treatment-naive chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2021;137(24):3327-3338.
80. Byrd JC, Wierda WG, Schuh A et al. Acalabrutinib monotherapy in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: updated phase 2 results. *Blood*. 2020;135(15):1204-1213.
81. Byrd JC, Hillmen P, Ghia P et al. Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2021;39(31):3441-3452.
82. Pleyer C, Wiestner A, Sun C. Immunological changes with kinase inhibitor therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(12):2792-2800.
83. de Weerd I, Hofland T, de Boer R et al. Distinct immune composition in lymph node and peripheral blood of CLL patients is reshaped during venetoclax treatment. *Blood Adv*. 2019;3(17):2642-2652.
84. Al-Sawaf O, Zhang C, Tandon M et al. Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(9):1188-1200.
85. Palmer S, Hanson CA, Zent CS et al. Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2008;141(5):607-614.
86. Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L et al. Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(10):1829-1836.
87. Nunes C, Wong R, Mason M, Fegan C, Man S, Pepper C. Expansion of a CD8(+)PD-1(+) replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. *Clin Cancer Res*. 2012;18(3):678-687.

88. Mackus WJM, Frakking FNJ, Grummels A et al. Expansion of CMV-specific CD8+CD45RA+CD27- T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;102(3):1057-1063.
89. Riches JC, Davies JK, McClanahan F et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 2013;121(9):1612-1621.
90. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing*. 2008;5:6.
91. Romero P, Zippelius A, Kurth I et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007;178(7):4112-4119.
92. Wu J, Xu X, Lee EJ et al. Phenotypic alteration of CD8+ T cells in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic reprogramming. *Oncotarget*. 2016;7(26):40558-40570.
93. Brusa D, Serra S, Coscia M et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):953-963.
94. Gonnord P, Costa M, Abreu A et al. Multiparametric analysis of CD8+ T cell compartment phenotype in chronic lymphocytic leukemia reveals a signature associated with progression toward therapy. *Oncoimmunology*. 2019;8(4):e1570774.
95. Jadidi-Niaragh F, Ghalamfarsa G, Yousefi M, Tabrizi MH, Shokri F. Regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: implication for immunotherapeutic interventions. *Tumour Biol*. 2013;34(4):2031-2039.
96. Jadidi-Niaragh F, Ghalamfarsa G, Memarian A et al. Downregulation of IL-17-producing T cells is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol*. 2013;34(2):929-940.
97. Mpakou VE, Ioannidou HD, Konsta E et al., Quantitative and qualitative analysis of regulatory T cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2017;60:74-81.

98. Piper KP, Karanth M, McLarnon A et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(2):154-163.
99. Lad DP, Varma S, Varma N, Sachdeva MU, Bose P, Malhotra P. Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(5):1012-1019.
100. Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A et al. Increased frequency of CD8(+) and CD4(+) regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. *Cancer Invest*. 2013;31(2):121-131.
101. D'Arena G, D'Auria F, Simeon V et al. A shorter time to the first treatment may be predicted by the absolute number of regulatory T cells in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2012;87(6):628-631.
102. Jadidi-Niaragh F, Jeddi-Tehrani M, Ansaripour B, Razavi SM, Sharifian RA, Shokri F. Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*. 2012;29(5):3561-3569.
103. Blanco G, Puiggros A, Sherry B et al. Chronic lymphocytic leukemia-like monoclonal B-cell lymphocytosis exhibits an increased inflammatory signature that is reduced in early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*. 2021;95:68-80.
104. Karmali R, Paganessi LA, Frank RR et al. Aggressive disease defined by cytogenetics is associated with cytokine dysregulation in CLL/SLL patients. *J Leukoc Biol*. 2013;93(1):161-170.
105. Rossmann ED, Lewin N, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Mellstedt H. Intracellular T cell cytokines in patients with B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Eur J Haematol*. 2002;68(5):299-306.
106. Kiaii S, Choudhury A, Mozaffari F, Kimby E, Osterborg A, Mellstedt H. Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): comparison of indolent and progressive disease. *Med Oncol*. 2005;22(3):291-302.

107. Guo B, Zhang L, Chiorazzi N, Rothstein TL. IL-4 rescues surface IgM expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;128(4):553-562.
108. Aguilar-Hernandez MM, Blunt MD, Dobson R et al. IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells. *Blood*. 2016;127(24):3015-3025.
109. Hus I, Bojarska-Junak A, Chocholska S et al. Th17/IL-17A might play a protective role in chronic lymphocytic leukemia immunity. *PLoS One*. 2013;8(11):e78091.
110. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*. 2012;120(7):1412-1421.
111. Palma M, Gentilcore G, Heimersson K et al. T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica*. 2017;102(3):562-572.
112. Ding W, LaPlant BR, Call TG et al. Pembrolizumab in patients with CLL and Richter transformation or with relapsed CLL. *Blood*. 2017;129(26):3419-3427.
113. Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood*. 2018;131(1):68-83.
114. Motta M, Rassenti L, Shelvin BJ et al. Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005;19(10):1788-1793.
115. Scrivener S, Kaminski ER, Demaine A, Prentice AG. Analysis of the expression of critical activation/interaction markers on peripheral blood T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence of immune dysregulation. *Br J Haematol*. 2001;112(4): 959-964.
116. Cantwell M, Hua T, Pappas J, Kipps TJ. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1997;3:984-989.
117. Zaborsky N, Gassner FJ, Asslaber D et al. CD1d expression on chronic lymphocytic leukemia B cells affects disease progression and induces T cell skewing in CD8 positive and CD4CD8 double negative T cells. *Oncotarget*. 2016;7(31):49459-49469.

118. Scrivener S, Goddard RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(3):383-389.
119. Mohr A, Renaudineau Y, Bagacean C, Pers JO, Jamin C, Bordron A. Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*. 2016;5(5):e1132977.
120. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(1):145-153.
121. Nüchel H, Rebmann V, Dürig J, Dührsen U, Grosse-Wilde H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(4):1694-1698.
122. Rizzo R, Audrito V, Vacca P et al. HLA-G is a component of the chronic lymphocytic leukemia escape repertoire to generate immune suppression: impact of the HLA-G 14 bp (rs66554220) polymorphism. *Haematologica*. 2014;99(5):888-896.
123. Byrd JC, Hargis JB, Kester KE et al. Opportunistic pulmonary infections with fludarabine in previously treated patients with low-grade lymphoid malignancies: a role for *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis. *Am. J. Hematol*. 1995;49:135-142.
124. Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann. Intern. Med*. 1998;129:559-566.
125. Gauthier M, Durrieu F, Martin E et al. Prognostic role of CD4 T-cell depletion after frontline fludarabine, cyclophosphamide and rituximab in chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer*. 2019;19(1):809.
126. Ysebaert L, Gross E, Kühlein E et al. Immune recovery after fludarabine-cyclophosphamide-rituximab treatment in B-chronic lymphocytic leukemia: implication for maintenance immunotherapy. *Leukemia*. 2010;24(7):1310-1316.
127. Egle A, Weiss L, Gassner F et al. Minimal residual disease (MRD) and T/NK cell dynamics during Fludarabine, Cyclophosphamide plus Rituximab (FCR) followed by Fludarabine plus Rituximab (FR) and remission maintenance therapy with Rituximab in previously

- untreated B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): risk factor stratification in the Chairou study. *Blood*. 2008;112(11):1089-1089.
128. Beyer M, Kochanek M, Darabi K et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005;106(6):2018-2025.
129. Gassner FJ, Weiss L, Geisberger R et al. Fludarabine modulates composition and function of the T cell pool in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(1):75-85.
130. Mackall CL. T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Stem Cells*. 2000;18(1):10-18.
131. Sharabi A, Haran-Ghera N. Immune recovery after cyclophosphamide treatment in multiple myeloma: implication for maintenance immunotherapy. *Bone Marrow Res*. 2011;2011:269519.
132. Martínez-Calle N, Hartley S, Ahearne M et al. Kinetics of T-cell subset reconstitution following treatment with bendamustine and rituximab for low-grade lymphoproliferative disease: a population-based analysis. *Br J Haematol*. 2019;184(6):957-968.
133. Saito H, Maruyama D, Maeshima AM et al. Prolonged lymphocytopenia after bendamustine therapy in patients with relapsed or refractory indolent B-cell and mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2015;5(10):e362.
134. Gaiolla R, Hartley S, Beech A et al. Extended follow-up of CD4+ T cell recovery kinetics in a large cohort of patients with B-cell lymphoproliferative disease treated with rituximab-bendamustine. *Hematol Oncol*. 2021;39(1):137-140.
135. García Muñoz R, Izquierdo-Gil A, Muñoz A, Roldan-Galiacho V, Rabasa P, Panizo C. Lymphocyte recovery is impaired in patients with chronic lymphocytic leukemia and indolent non-Hodgkin lymphomas treated with bendamustine plus rituximab. *Ann Hematol*. 2014;93(11):1879-1887.

136. Georgiana G, Perez-Andres M, Barrena S et al. Effects of Bendamustine plus Rituximab on the distribution of normal peripheral blood leucocyte populations in advanced stage chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2013;122(21):5289.
137. Laszlo D, Bassi S, Andreola G et al. Peripheral T-lymphocyte subsets in patients treated with Rituximab-Chlorambucil combination therapy for indolent NHL. *Ann Hematol*. 2006;85(11):813-814.
138. Solman IG, Blum LK, Hoh HY et al. Ibrutinib restores immune cell numbers and function in first-line and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2020;97:106432.
139. Kondo K, Shaim H, Thompson PA et al. Ibrutinib modulates the immunosuppressive CLL microenvironment through STAT3-mediated suppression of regulatory B cell function and inhibition of the PD-1/PD-L1 pathway. *Leukemia*. 2018;32(4):960-970.
140. Dubovsky JA, Beckwith KA, Natarajan G et al. Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood*. 2013;122:2539-2549.
141. Puzzolo MC, Del Giudice I, Peragine N et al. TH2/TH1 Shift Under Ibrutinib Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front. Oncol*. 2021;11:637186.
142. Long M, Beckwith K, Do P et al. Ibrutinib treatment improves T cell number and function in CLL patients. *J Clin Invest*. 2017;127(8):3052-3064.
143. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S et al. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(4):323-332.
144. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(22):3390-3397.
145. Ali K, Soond DR, Pineiro R et al. Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. *Nature*. 2014;510(7505):407-411.

146. Lampson BL, Kasar SN, Matos TR et al. Idelalisib given front-line for treatment of chronic lymphocytic leukemia causes frequent immune-mediated hepatotoxicity. *Blood*. 2016;128(2):195-203.
147. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007.
148. O'Brien SM, Lamanna N, Kipps TJ et al. A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(25):2686-2694.
149. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ et al. Phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*. 2010;116(12):2078-2088.
150. Rohrbacher L, Brauchle B, Ogrinc Wagner A, von Bergwelt-Baildon M, Bücklein VL, Subklewe M. The PI3K δ -Selective Inhibitor Idelalisib Induces T- and NK-Cell Dysfunction Independently of B-Cell Malignancy-Associated Immunosuppression. *Front Immunol*. 2021;12:608625.
151. Zelenetz AD, Barrientos JC, Brown JR et al. Idelalisib or placebo in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: interim results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(3):297-311.
152. Sehn LH, Hallek M, Jurczak W. A Retrospective Analysis of Pneumocystis Jirovecii Pneumonia Infection in Patients Receiving Idelalisib in Clinical Trials. *Blood*. 2016;128(22):3705.
153. Vassilopoulos S, Shehadeh F, Kalligeros M, Tran QL, Schiffman F, Mylonakis E. Targeted therapies in CLL/SLL and the cumulative incidence of infection: A systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol*. 2022;13:989830.
154. Kay NE, Zarling JM. Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood*. 1984;63(2):305-309.

155. Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Rodriguez AP et al., Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. *PLoS One*. 2014;9(10):e108326.
156. Parry HM, Stevens T, Oldreive C et al. NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma. *Oncotarget*. 2016;7(42):68513-68526.
157. Veuillen C, Aurran-Schleinitz T, Castellano R et al. Primary B-CLL resistance to NK cell cytotoxicity can be overcome in vitro and in vivo by priming NK cells and monoclonal antibody therapy. *J Clin Immunol*. 2012;32(3):632-646.
158. Costello RT, Knoblauch B, Sanchez C, Mercier D, Le Treut T, Sébahoun G. Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2012;135(2):151-157.
159. Villa-Álvarez M, Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S et al. Ig-like transcript 2 (ILT2) blockade and lenalidomide restore NK cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Front Immunol*. 2018;9:2917.
160. Hadadi L, Hafezi M, Amirzargar AA, Sharifian RA, Abediankenari S, Asgarian-Omran H. Dysregulated expression of Tim-3 and NKp30 receptors on NK cells of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Res Treat*. 2019;42(4):202-208.
161. McWilliams EM, Mele JM, Cheney C et al. Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*. 2016;5(10):e1226720.
162. Hofland T, Endstra S, Gomes CKP et al. Natural killer cell hypo-responsiveness in chronic lymphocytic leukemia can be circumvented in vitro by adequate activating signaling. *Hemasphere*. 2019;3(6):e308.
163. MacFarlane AW 4th, Jillab M, Smith MR et al. NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors. *Oncoimmunology*. 2017;6(7):e1330235.

164. Wang WT, Zhu HY, Wu YJ et al. Elevated absolute NK cell counts in peripheral blood predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(3):449-457.
165. Levy I, Vadasz Z, Polliack A, Tadmor T. The Frequency and Prognostic Value of Neutrophilia in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Anticancer Res*. 2018;38(8):4731-4734.
166. Itälä M, Vainio O, Remes K. Functional abnormalities in granulocytes predict susceptibility to bacterial infections in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol*. 1996;57(1):46-53.
167. Zeya HI, Keku E, Richards F 2nd, Spurr Cl. Monocyte and granulocyte defect in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Pathol*. 1979;95(1):43-54.
168. Manukyan G, Papajik T, Gajdos P et al. Neutrophils in chronic lymphocytic leukemia are permanently activated and have functional defects. *Oncotarget*. 2017;8(49):84889-84901.
169. Kontoyiannis DP, Georgiadou SP, Wierda WG et al. Impaired bactericidal but not fungicidal activity of polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(8):1730-1733.
170. Podaza E, Risnik D, Colado A et al. Chronic lymphocytic leukemia cells increase neutrophils survival and promote their differentiation into CD16high CD62Ldim immunosuppressive subset. *Int J Cancer*. 2019;144:1128-1134.
171. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S et al. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica*. 2013;98(7):1115-1123.
172. Friedman DR, Sibley AB, Owzar K et al. Relationship of blood monocytes with chronic lymphocytic leukemia aggressiveness and outcomes: a multi-institutional study. *Am J Hematol*. 2016;91(7):687-691.
173. Qorraj M, Bruns H, Böttcher M et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to immune metabolic dysfunctions of monocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(2):470-478.

174. Palumbo GA, Parrinello NL, Giallongo C et al. Monocytic myeloid derived suppressor cells in hematological malignancies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):5459.
175. Gustafson MP, Abraham RS, Lin Y et al. Association of an increased frequency of CD14+ HLA-DR lo/neg monocytes with decreased time to progression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Br J Haematol.* 2012;156(5):674-676.
176. Jitschin R, Braun M, Büttner M et al. CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood.* 2014;124(5):750-760.
177. Liu J, Zhou Y, Huang Q, Qiu L. CD14(+)HLA-DR(low/-) expression: A novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett.* 2015;9(3):1167-1172.
178. Giannoni P, Pietra G, Travaini G et al. Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica.* 2014;99(6):1078-1087.
179. Audrito V, Serra S, Brusa D et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2015;125(1):111-123.
180. Boissard F, Fournié JJ, Laurent C, Poupot M, Ysebaert L. Nurse like cells: chronic lymphocytic leukemia associated macrophages. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(5):1570-1572.
181. Boissard F, Laurent C, Ramsay AG et al. Nurse-like cells impact on disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2016;6(1):e381.
182. Toniolo PA, Liu S, Yeh JE, Ye DQ, Barbuto JA, Frank DA. Deregulation of SOCS5 suppresses dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(29):46301-46314.
183. Schlesinger M, Broman I, Lugassy G. The complement system is defective in chronic lymphatic leukemia patients and in their healthy relatives. *Leukemia.* 1996;10(9):1509-1513.

184. Varga L, Czink E, Miszlai Z et al. Low activity of the classical complement pathway predicts short survival of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Exp Immunol.* 1995;99(1):112-116.
185. Michelis R, Tadmor T, Barhoum M et al. A C5a-Immunoglobulin complex in chronic lymphocytic leukemia patients is associated with decreased complement activity. *PLoS One.* 2019;14(1):e0209024.
186. Michelis R, Tadmor T, Aviv A et al. Cell-free IgG-aggregates in plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia cause chronic activation of the classical complement pathway. *PLoS One.* 2020;15(3):e0230033.
187. Naseraldeen N, Michelis R, Barhoum M et al. The Role of Alpha 2 Macroglobulin in IgG-Aggregation and Chronic Activation of the Complement System in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Immunol.* 2021;11:603569.
188. García-Muñoz R, Roldan GV, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann Hematol.* 2012;91(7):981-996.
189. Tesfa D, Palmblad J. Late-onset neutropenia following rituximab therapy: incidence, clinical features and possible mechanisms. *Expert Rev. Hematol.* 2011;4:619-625.
190. Molina MS, Hoffman EA, Stokes J et al. Regulatory Dendritic Cells Induced by Bendamustine Are Associated With Enhanced Flt3 Expression and Alloreactive T-Cell Death. *Front Immunol.* 2021;12:699128.
191. Middleton O, Cosimo E, Dobbin E et al. Complement deficiencies limit CD20 monoclonal antibody treatment efficacy in CLL. *Leukemia.* 2015;29:107-114.
192. Bordron A, Bagacean C, Mohr A et al. Resistance to complement activation, cell membrane hypersialylation and relapses in chronic lymphocytic leukemia patients treated with rituximab and chemotherapy. *Oncotarget.* 2018;9(60):31590-31605.
193. Zhu S, Gokhale S, Jung J et al. Multifaceted Immunomodulatory Effects of the BTK Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib on Different Immune Cell Subsets - Beyond B Lymphocytes. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:727531.

194. Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP et al. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica*. 2015;100(1):77-86.
195. Flinsenbergh TWH, Tromedjo CC, Hu N et al. Differential effects of BTK inhibitors ibrutinib and zanubrutinib on NK-cell effector function in patients with mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2020;105(2):e76-e79.
196. Varughese T, Taur Y, Cohen N et al. Serious Infections in Patients Receiving Ibrutinib for Treatment of Lymphoid Cancer. *Clin Infect Dis*. 2018;67(5):687-692.
197. Alflen A, Stadler N, Aranda Lopez P et al. Idelalisib impairs TREM-1 mediated neutrophil inflammatory responses. *Sci Rep*. 2018;8(1):5558.
198. Davids MS, Hallek M, Wierda W et al., Comprehensive Safety Analysis of Venetoclax Monotherapy for Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2018;24(18):4371-4379.
199. Stiff A, Trikha P, Wesolowski R et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Express Bruton's Tyrosine Kinase and Can Be Depleted in Tumor-Bearing Hosts by Ibrutinib Treatment. *Cancer Res*. 2016;76(8):2125-2136.
200. Fiorcari S, Maffei R, Audrito V et al. Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(40):65968-65981.
201. Braun C, Schlaweck S, Daecke SN, Brossart P, Heine A. The PI3K δ inhibitor idelalisib impairs the function of human dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70(12):3693-3700.
202. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745-2760.
203. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA et al. Rituximab plus chlorambucil as first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia: Final analysis of an open-label phase II study. *J Clin Oncol*. 2014;32(12):1236-1241.

204. Schliffke S, Sivina M, Kim E et al. Dynamic changes of the normal B lymphocyte repertoire in CLL in response to ibrutinib or FCR chemo-immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2018;7(4):e1417720.
205. Bojarska-Junak A, Hus I, Sieklucka M et al. Natural killer-like T CD3+/CD16+CD56+ cells in chronic lymphocytic leukemia: intracellular cytokine expression and relationship with clinical outcome. *Oncol Rep*. 2010;24(3):803-810.
206. Rissiek A, Schulze C, Bacher U et al. Multidimensional scaling analysis identifies pathological and prognostically relevant profiles of circulating T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. 2014;135(10):2370-2379.
207. Mélet J, Mulleman D, Goupille P, Ribourtout B, Watier H, Thibault G. Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2783-2790.
208. Weiss L, Melchardt T, Egle A, Grabmer C, Greil R, Tinhofer I. Regulatory T cells predict the time to initial treatment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2011;117(10):2163-2169.
209. Dasgupta A, Mahapatra M, Saxena R. A study for proposal of use of regulatory T cells as a prognostic marker and establishing an optimal threshold level for their expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(6):1831-1838.
210. Giannopoulos K, Schmitt M, Kowal M et al. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep*. 2008;20(3):677-682.
211. D'Arena G, Rossi G, Minervini MM et al. Circulating regulatory T cells in "clinical" monoclonal B-cell lymphocytosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(4):915-923.

11. Přílohy

11.1. Určení klinického stadia dle Raie

stádium 0	Lymfocytóza
stádium I	Lymfocytóza + lymfadenopatie
stádium II	Lymfocytóza + spleno – nebo hepatomegalie
stádium III	Lymfocytóza + anémie (hemoglobin <110 g/l)
stádium IV	Lymfocytóza + trombocytopenie (<100x10 ⁹ /l)

11.2. Indikace k zahájení léčby CLL (dle doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukémie ČSCLL 2021).

K definici aktivního onemocnění a zahájení léčby je nutné splnit nejméně jedno z následujících kritérií:

1. Průkaz progresivního selhání kostní dřeně, které se projevuje rozvojem nebo zhoršením anémie a/nebo trombocytopenie.
2. Masivní (tj. >6 cm pod levým žeberním obloukem) nebo progresivní nebo symptomatická splenomegalie.
3. Masivní lymfadenopatie (tj. >10 cm v nejdelším průměru) nebo progresivní nebo symptomatická lymfadenopatie.
4. Progresivní lymfocytóza se vzestupem >50 % během 2 měsíců nebo doba zdvojnásobení počtu lymfocytů (LDT) kratší než 6 měsíců
5. Autoimunitní anémie a/nebo trombocytopenie špatně odpovídající na kortikosteroidy nebo jinou standardní léčbu.
6. Nejméně jeden z následujících systémových příznaků souvisejících s onemocněním:
 - a. Nechtěný úbytek hmotnosti $\geq 10\%$ v průběhu předchozích 6 měsíců
 - b. Významná únava (tj. výkonnostní stav dle ECOG 2 nebo horší, nemožnost pracovat nebo provádět obvyklé činnosti)
 - c. Horečky nad 38 °C po dobu 2 nebo více týdnů bez průkazu infekce
 - d. Noční pocení po dobu delší než 1 měsíc bez průkazu infekce

11.3. Dávkování režimů CHIT

FCR:

- rituximab 375 mg/m² i.v. v den 1 cyklu 1, 500 mg/m² i.v. v den 1 cyklů 2-6.
- fludarabin 40 mg/m² p.o., nebo 25 mg/m² i.v. v den 1-3 všech cyklů.
- cyklofosfamid 250 mg/m² i.v., nebo p.o. v den 1-3 všech cyklů.

BR:

- rituximab 375 mg/m² i.v. v den 1 cyklu 1, 500 mg/m² i.v. v den 1 cyklů 2-6.
- bendamustin 90 mg/m² i.v. v den 1-2 všech cyklů.

O-Clb:

- obinutuzumab 100 mg/m² i.v. v den 1 cyklu 1, 900 mg/m² i.v. v den 2 cyklu 1, 1000 mg/m² i.v. v den 8 a 15 cyklu 1 a v den 1 cyklů 2-6.
- chlorambucil 0,5 mg/kg p.o. v den 1 a 15 všech cyklů.

R-Clb:

- rituximab 375 mg/m² i.v. v den 1 cyklu 1, 500 mg/m² i.v. v den 1 cyklů 2-6.
- chlorambucil 10mg/m² p.o. v den 1-7 všech cyklů.