

\*Joanna Dziaczkowska-Suszek, Małgorzata Krawczyk-Kuliś,  
Aleksandra Bartkowska-Chrobok, Sławomira Kyrz-Krzemień

## Znaczenie badania czynników prognostycznych przy rozpoznaniu przewlekłej białaczki limfocytowej

### The importance of assessment the prognostic factors at diagnosis of chronic lymphocytic leukemia

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Sławomira Kyrz-Krzemień

#### Streszczenie

Pacjenci z przewlekłą białaczką limfocytową (PBL) tworzą niejednorodną klinicznie grupę chorych, różniących się przebiegiem choroby, czasem przeżycia i odpowiedzią na leczenie. W celu optymalizacji strategii leczenia i jego monitorowania u chorych z PBL oznacza się szereg parametrów prognostycznych. Celem opracowania była ocena częstości występowania czynników klinicznych, hematologicznych, biochemicznych, immunofenotypowych i cytogenetycznych o potencjalnym znaczeniu prognostycznym u chorych w momencie rozpoznania PBL. W grupie 46 pacjentów, bez leczenia, kierowanych do diagnostyki i/lub leczenia w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Katowicach oceniano: stopień zaawansowania klinicznego choroby, podstawowe parametry biochemiczne oraz metodą cytometrii przepływowej oznaczono fenotyp komórek PBL, a także czynniki rokownicze (CD38, CD49d, CD11c, CD54). Ekspresję ZAP-70 oznaczano metodą immunocytochemiczną w preparatach cytologicznych. Badania aberracji cytogenetycznych przeprowadzono metodą fluorescencyjnej hybrydizacji in situ (FISH). Oceniano występowanie: del(13) (q14), del(11) (q22-q23), del(17) (p13.1), trisomii 12.

U 9% pacjentów nie stwierdzono podwyższonej leukocytozy, niedokrwistość występowała u 7%, a małopłytkowość u 11%, powiększenie obwodowych węzłów chłonnych u 74%, a śledziona u 50%. Większość zgłaszała się z niskim stopniem zaawansowania klinicznego wg Binnetta (54% chorych). Dodatni wynik ekspresji antygenów CD38, CD49d, CD11c i CD54 stwierdzono u odpowiednio: 37, 30, 33 i 70% badanych. Spośród aberracji cytogenetycznych najczęściej występowała del(13) (q14) – 39%, del(11) (q22-23) – 13%, trisomia 12 – 11%. Del(17) (p13.1) stwierdzono u 7%.

W codziennej praktyce klinicznej, poza oceną parametrów hematologicznych, biochemicznych i klinicznych wydaje się wskazane oznaczanie czynników prognostycznych ocenianych metodą immunofenotypizacji, ze szczególnym uwzględnieniem CD38, CD49d i ZAP-70, ze względu na duże rozpowszechnienie i ogólną dostępność metod ich oznaczania.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka limfocytowa, czynniki rokownicze, cytometria przepływowa

#### Summary

Patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) are a clinically heterogeneous group of patients, differing in the course of the disease, survival and response to treatment. In order to optimize the treatment strategy and monitoring of patients with CLL a number of predictive parameters is used. The aim of the study was to evaluate the prevalence of clinical factors, hematological, biochemical, and cytogenetic, and immunophenotypic of potential prognostic in patients with CLL at diagnosis. In the group of 46 patients, without treatment, led to a diagnosis and/or treatment at the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation in Katowice were evaluated: clinical stage of disease, and basic biochemical parameters were determined, and using flow cytometry method CLL cell phenotype and prognostic factors (CD38, CD49d, CD11c, CD54) were tested also. ZAP-70 expression was determined by immunocytochemistry method in cytological preparations. Cytogenetics studies were performed by fluorescence in situ hybridization (FISH). Estimated distribution: del(13) (q14), del(11) (q22-q23), trisomy 12, del(17) (p13.1).

In 9% of patients elevated leukocytosis were observed, anemia occurred in 7% and thrombocytopenia in 11%, enlarged peripheral lymph nodes in 74 and 50% of the spleen. The most of the reported patients presented low clinical stage by Binnet (54%). A positive result of the expression of antigens CD38, CD49d, CD11c and CD54 were found in 37, 30, 33 and 70%, respectively. Cytogenetic aberrations were observed as follows: del (13) (q14) – 39%, del (11) (q22-q23) – 13%, trisomy 12 – 11%. Del(17) (p13.1) was observed in 7%. In everyday clinical practice, in addition to investigate the parameters of hematology, clinical chemistry, it seems appropriate determination of prognostic factors evaluated by immunophenotypisation, with particular emphasis on CD38, CD49d and ZAP-70, due to the high prevalence and the general availability of the methods for their determination.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, prognostic factors, flow cytometry

## WSTĘP

W diagnostyce przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL) powszechnie wykorzystuje się badanie ekspresji antygenów komórkowych metodą wielokolorowej cytometrii przepływowej. Komórki PBL charakteryzują się ekspresją antygenów: CD19, CD20, CD23, CD43, a także słabą ekspresją immunoglobulin powierzchniowych oraz CD22 i CD79b. Wyróżnia je koekspresja antygeny CD5. Brak ekspresji CD10, CD25, CD103, FMC7 oraz cykliny D1 pozwala na różnicowanie z innymi typami chłoniai B-komórkowego (1, 2). Na podstawie badań immunofenotypowych, dla potrzeb diagnostycznych został stworzony specjalny system punktowy („scoring system”), który dla potwierdzenia PBL wymaga spełnienia 4 z 5 wymienionych w tabeli 1 kryteriów (1). Wynik powyżej 4 punktów, stwierdzany w 92% przypadków PBL, silnie sugeruje rozpoznanie PBL.

Tabela 1. Fenotypowy system punktowy stosowany w diagnostyce PBL (wg Matutes i wsp. 2000).

Antygen	Punktacja	
	1	0
Smlg	Słaba ekspresja	Silna ekspresja
CD5	Dodatnia ekspresja	Brak ekspresji
CD23	Dodatnia ekspresja	Brak ekspresji
FMC7	Brak ekspresji	Dodatnia ekspresja
CD22 lub CD79b	Słaba ekspresja	Silna ekspresja

Badania nad poznaniem patomechanizmu powstawania komórek PBL, pomimo że nie przyniosły jeszcze ostatecznego wyjaśnienia, dostarczają wielu danych świadczących o heterogenności ich powstawania. Obecność mutacji somatycznej w genach kodujących region zmienny łańcucha ciężkiego immunoglobulin  $IgV_H$  wskazuje na niejednorodne pochodzenie klonów białaczkowych PBL. Zjawisko to wynika z przechodzenia limfocytów B przez centra rozrodcze w guzłach chłonnych, gdzie mają kontakt z antygenem i gdzie dokonuje się mutacja  $IgV_H$ . Uważa się, że komórki bez mutacji  $IgV_H$  nie przeszły przez centra rozrodcze. Według różnych źródeł szacuje się, że jest ich 1/3 lub połowa przypadków (3). Fakt ten skłonił naukowców do szukania wspólnego mianownika dla obu przypadków (z mutacją i bez mutacji  $IgV_H$ ) oraz poszukania jednego wspólnego czynnika powodującego transformację białaczkową tych komórek. Różnice pomiędzy klonami komórek z i bez mutacji  $IgV_H$ , które przejawiają się w tempie progresji choroby oraz w stopniu nasilenia objawów klinicznych (4) również nie pozwalają na ostateczne wyjaśnienie patogenezy choroby.

Rozpoczęcie leczenia chorego z PBL jest uzależnione od stopnia zaawansowania choroby lub jej progresywnego charakteru. Pacjenci z PBL różnią się przebiegiem choroby, czasem przeżycia i odpowiedzią na leczenie.

Zróznicowany przebieg kliniczny przewlekłej białaczki limfocytowej u chorych z tym samym stopniem zaawansowania klinicznego stwarza trudność w podej-

mowaniu decyzji o rozpoczęciu i rodzaju chemioterapii. Łatwy dostęp do procedur diagnostycznych powoduje, że coraz częściej chorobę rozpoznaje się we wczesnym stadium jej zaawansowania, a decyzja o rozpoczęciu terapii powinna być optymalna zarówno co do czasu jej rozpoczęcia, jak i jej rodzaju. Dostępność różnorodnych form terapii o różnej aktywności i różnym ryzyku powikłań (od strategii „obserwuj i czekaj – *watch and wait*” do allogenicznego przeszczepienia szpiku) uzasadnia znalezienie skutecznego narzędzia w celu optymalizacji strategii postępowania terapeutycznego. Poszukiwanie nowych czynników rokowniczych w PBL ułatwiających podejmowanie decyzji dotyczących rodzaju leczenia, optymalne monitorowanie kliniczne oraz wypracowanie nowych strategii terapeutycznych jest obecnie przedmiotem wielu doniesień naukowych. Aktualnie stosuje się tzw. nomenklaturę klasycznych i nowych czynników rokowniczych w PBL, zawartych w tabeli 2 (5).

Tabela 2. Czynniki rokownicze w PBL (wg Montillo i wsp. 2005).

Czynniki prognostyczne	Niskie ryzyko	Wysokie ryzyko
<b>Klasyczne</b>		
System Bineta	A	B, C
Naciekanie szpiku kostnego	Grudkowy	Rozlany
Atypowa morfologia	Nie	Tak
Czas podwojenia limfocytozy	≤ 12 miesięcy	> 12 miesięcy
<b>Nowe</b>		
Markery surowicze*	Prawidłowe	Podwyższone
Kariotyp	Prawidłowy, 13q-	11q-, 17p-
CD38	≤ 30%	> 30%
$IgV_H$	Zmutowany	Niezmutowany
ZAP-70	< 20%	> 30%

\*Stężenie  $\beta_2$ -mikroglobuliny, aktywność kinazy tymidynowej, rozpuszczalne CD23

Badania czynników prognostycznych są szczególnie ważne u tych pacjentów, którzy nie spełniają obecnie obowiązujących kryteriów do rozpoczęcia leczenia lub jego intensyfikacji, a potencjalnie mogliby odnieść korzyść z wcześniej rozpoczętej terapii. Dlatego, w momencie rozpoznania choroby, niezbędna jest ocena jej stopnia zaawansowania i ocena czynników ryzyka. Oceniając wartość rokowniczą danego czynnika, analizujemy jego wpływ na całkowity czas przeżycia i czas przeżycia wolny od progresji rozumianej jako zmiana stadium zaawansowania klinicznego lub pojawienie się wskazań do rozpoczęcia leczenia. Wartość predykcyjna danego czynnika pozwala natomiast przewidzieć odpowiedź pacjenta na leczenie (6). Podstawą takiej oceny są opracowane niezależnie przez Rai i wsp. oraz Bineta i wsp. klasyfikacje kliniczne, obie oparte na podstawowej ocenie przedmiotowej i standardowych testach laboratoryjnych. Polegają one na ocenie stopnia zajęcia układu chłonnego oraz stopnia niedokrwistości

i/lub małopłytkowości bez względu na ich przyczynę (immunologiczną lub wyparcie szpiku). Zakwalifikowanie pacjenta do jednej z grup ryzyka pozwala na ocenę rokowania co do czasu przeżycia (1).

Dynamicznie prowadzone są badania oceniające przydatność poszczególnych czynników pełniących kluczowe funkcje w kontroli przeżycia i aktywności limfocytów B oraz regulacji homeostazy całej populacji limfocytów B. Uważa się, że najważniejszą grupą czynników prognostycznych są aberracje chromosomowe wykrywane głównie metodą fluorescencyjnej hybrydizacji in situ (FISH): del(13)(q14), del(11)(q22-q23), trisomię 12, del(17)(p13.1) (7).

Szereg innych czynników posiadających udowodnioną wartość prognostyczną nie bada się rutynowo w codziennej praktyce klinicznej ze względu na wysokie koszty badania, brak standaryzacji metody, lub też z powodu braku ich bezpośredniego wpływu na decyzje terapeutyczne. Do tej grupy wskaźników zaliczane są: stężenie  $\beta_2$  mikroglobuliny, aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH), rozpuszczalny antygen CD23, aktywność kinazy tymidynowej, ekspresja CD38, ZAP-70 i obecność mutacji somatycznych genów kodujących region zmienny łańcucha ciężkiego immunoglobulin ( $IgV_H$ ) (6). W obrębie klonu białaczkowego brak mutacji  $IgV_H$  stanowi jeden z najważniejszych wskaźników gorszego rokowania, co do całkowitego przeżycia oraz czasu wolnego od progresji u chorych (4). Wysoki koszt badania i duży stopień trudności oraz mała dostępność ograniczona wyłącznie do wyspecjalizowanych ośrodków powodują zasadnicze ograniczenia metody oznaczania stanu mutacji  $IgV_H$ . Ograniczenia te stały się powodem znalezienia czynników „zastępczych”, szerzej dostępnych w codziennej praktyce klinicznej. Należą do nich badania kinazy ZAP-70 i antygeny CD38 i CD49d. Dane o stanie mutacji somatycznej, ekspresji CD38, CD49d i ZAP-70 wykorzystuje się do stratyfikacji chorych według czynników rokowniczych (4, 8-13).

Na skutek rozwoju technik badawczych, szczególnie cytogenetyki i biologii molekularnej, odkrywany jest cały szereg nowych czynników biorących udział w patogenezie PBL, a także oceniana jest ich przydatność rokownicza i predykcyjna. Prowadzi się badania oceniające przydatność poszczególnych molekuł pełniących kluczowe funkcje w kontroli przeżycia i aktywności limfocytów B oraz regulacji homeostazy całej populacji limfocytów B, między innymi cząstek adhezyjnych, jako wskaźników prognostycznych. Metoda wielokolorowej cytometrii przepływowej, dzięki której wykrywana jest ekspresja antygenów powierzchniowych i cytoplazmatycznych (14), w tym antygeny CD38 (15), oraz cząstek adhezyjnych (CD49d, CD11c, CD54) (16) jest ogólnie dostępna dla codziennej praktyki klinicznej.

Dla oznaczenia ekspresji ZAP-70 dostępnych jest kilka metod diagnostycznych, dających porównywalne wyniki, między innymi RT-PCR, Western blot oraz metody immunofenotypowe, w tym wielokolorowa cytometria przepływowa. Należy podkreślić, że tylko

metoda cytometrii przepływowej daje możliwość wiarygodniejszej analizy ekspresji ZAP-70 w komórkach PBL oraz w populacji limfocytów T i komórek NK. Metody RT-PCR i Western blot są obciążone ryzykiem uzyskania fałszywie dodatnich wyników, gdyż analizowana jest cała populacja komórek jednojądrzastych, łącznie z limfocytami T i komórkami NK, które charakteryzują się wysoką ekspresją ZAP-70 (9). Oznaczanie cytoplazmatycznej ekspresji ZAP-70 metodą cytometrii przepływowej znajduje się nadal na etapie standaryzacji.

Molekuły adhezyjne (glikoproteiny spełniające funkcje białek receptorowych) są integralną częścią błony komórkowej. W warunkach fizjologicznych pomagają w utrzymaniu ciągłości tkankowej oraz w interakcjach międzykomórkowych. Biorą udział w procesach gojenia się ran, w immunologicznych mechanizmach obronnych, w migracji limfocytów przez ściany naczyń krwionośnych do ognisk zapalnych oraz w hematopojezie. Biorą także aktywny udział w przebiegu procesu nowotworowego i w procesie tworzenia przerzutów, gdzie komórki nowotworowe migrują w obrębie otaczających je komórek i tkanek, a także uczestniczą w procesach angiogenezy, utraty ciągłości i integralności międzykomórkowej oraz przerzutów do innych tkanek. Do rodziny molekuł adhezyjnych należą CD49d, CD11c oraz CD54. CD49d zalicza się do grupy integryn  $\beta 1$ , CD11c do grupy integryn  $\beta 2$ , natomiast CD54, zwany ICAM-1, należy do nadrodziny immunoglobulin. Integryny są odpowiedzialne za przenoszenie sygnałów ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. Mechanizm ich działania polega na rozpoznawaniu białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak kolagen, fibronektyna, witronektyna, winkulina i fibrynogen. Po związaniu odpowiedniego ligandu z macierzą zewnątrzkomórkową łączą się z włóknami aktyny. W strukturach tych znaleziono także białka cytoszkieletowe (16, 17).

Pomimo, że przedstawione badania obejmują szeroki panel czynników rokowniczych, to nadal obowiązują kryteria rozpoczęcia leczenia ustalone przez Grupę Roboczą Narodowego Instytutu Raka w USA (NCIWG) powszechnie akceptowane i stosowane w praktyce klinicznej (2). Według tych klasycznych wskazań leczenie w PBL należy rozpocząć u chorych:

1. W zaawansowanym okresie klinicznym.
2. Gdy dochodzi do dynamicznego narastania masy guza:
  - ponad 50% wzrost limfocytozy w okresie krótszym niż 2 miesiące, lub czas podwojenia limfocytozy < 6 miesięcy,
  - znaczne powiększenie śledziony (dolny brzeg > 6 cm pod łukiem żebrowym),
  - masa węzłowa > 10 cm w największym wymiarze.
3. W przypadku niewydolności hematopojezy – niedokrwistość i/lub małopłytkowość (z wyparcia).
4. W przypadku niedokrwistości hemolitycznej (AIHA) lub małopłytkowości immunologicznej (ITP) odpornej na inne metody leczenia.
5. W przypadku wystąpienia objawów ogólnych, takich jak chudnięcie, gorączka i osłabienie.

W przypadkach kwalifikowania chorych do intensywnych terapii, łącznie z przeszczepieniem allogenicznym komórek krwiotwórczych, coraz częściej wykorzystywane są wyniki badań czynników prognostycznych, co uzasadnia rutynowe oznaczanie ich w momencie rozpoznania choroby. Do tego celu najczęściej wykorzystuje się metodę immunofenotypizacji ze względu na istotną łatwość i dostępność wielokolorowej cytometrii przepływową w codziennej praktyce klinicznej.

W codziennej praktyce klinicznej w diagnostyce PBL nie stosuje się wszystkich opisanych metod badawczych. Zalecane jest jednak, by panel zastosowanych metod był optymalnie szeroki. W tym celu, w realizowanym badaniu przeanalizowano wykorzystanie metod diagnostycznych oraz czynników o potencjalnym znaczeniu prognostycznym u pacjentów z PBL.

## MATERIAŁ

W Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Katowicach zbadano grupę 46 osób z PBL, uprzednio nieleczonych, spełniających podstawowe kryteria rozpoznania wg NCI-WorkingGroup (2).

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, zgodnie z uchwałą Nr KNW/0022/KB1/176/08 z dnia 17.12.2008 roku oraz KNW/0022/KB1/137/10 z dnia 23.11.2010 roku. Praca naukowa powstała dzięki finansowaniu ze środków przeznaczonych na badanie własne nr KNW-2-130/09 oraz statutowe nr KNW-1-052/10 Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

## METODY

Fenotyp komórek PBL (CD19, CD5, CD20, CD23, CD79b, CD22, FMC-7, slg, kappa, lambda), czynniki rokownicze (CD38, CD49d, CD11c, CD54) oznaczano metodą cytometrii przepływową. Powyższe antygeny oznaczano na powierzchni badanych komórek krwi obwodowej. Jako dodatnie traktowano wyniki powyżej 30% ekspresji antygenów CD38 (11), CD49d (12), CD11c (18), CD54 (19, 20). Ekspresja powyższych markerów była analizowana w populacji komórek białaczkowych CD5+19+. Badania były przeprowadzone metodą trójkolorowej fluorescencji, z wykorzystaniem cytometru przepływowego EPICS-XL-MCL i programu System II firmy Beckman-Coulter.

ZAP-70 oznaczano metodą immunocytochemiczną w preparatach cytologicznych uzyskiwanych przez izolację komórek jednojądrzastych na gradiencie (FicollPaque Premium, GE Healthcare Formerly Amersham, Bioscience) i następnie wykonaniu preparatów cytospinowych za pomocą wirówki cytologicznej i ich utrwaleniu. Do oznaczenia ekspresji ZAP-70 użyto przeciwciała mysiego (ZAP-70 klon 2F3.2, Dako). Barwienie immunocytochemiczne wykonano z użyciem polimeru znakowanego peroksydazą chrzaniową sprzężoną z anty-mysią IgG i następnie DAB+ chromogen (roztwór 3,3'-dwuaminobenzyny) oraz hematoxyliną (DAKO) (21). Preparat oceniano na podstawie intensywności jądrowej i cytoplazmatycznej

reakcji barwnej w badanych komórkach. Zgodnie z literaturą (21), jako kontrolę dodatnią traktowano limfocyty T i komórki NK charakteryzujące się bardzo silną ekspresją ZAP-70. Jako kontrolę ujemną uważano prawidłowe limfocyty B, w których nie stwierdza się reakcji barwnej. Populacja komórek białaczkowych w przypadku obecności ZAP-70 wykazywała umiarkowaną reakcją barwną. Jako dodatnie traktowano wyniki powyżej 20% komórek wykazujących umiarkowaną ekspresję ZAP-70 (8, 9).

Badania aberracji cytogenetycznych metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) przeprowadzono na komórkach krwi obwodowej poddanych krótkotrwałej hodowli komórkowej (24-48h) w sterylnych naczyniach hodowlanych, w podłożu RPMI1640, z dodatkiem 20% surowicy płodowej cielęcej oraz mitogenu (Lectin). Hodowle zatrzymywano kolcemidem o końcowym stężeniu 0,2 ug/ml hodowli, komórki utrwalano. Po wysuszeniu preparatów w temperaturze pokojowej przeprowadzono hybrydyzację, zgodnie z protokołem Vysis, stosując sondy: LSI p53/LSI ATM i LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12. Analizowano 150-300 jąder interfazowych z wykorzystaniem programu ISIS (MetaSystems).

## WYNIKI

Szczegółowo przebadano grupę 46 pacjentów w wieku 28-83 lat (mediana – 60 lat), częściej mężczyzn (M/K- 27/19) (tab. 3).

W 4 przypadkach spośród 46 (9%) nie stwierdzono podwyższenia ilości leukocytów we krwi obwodowej. Wykazano jednak obecność monoklonalnej puli komórek CD5+19+. U 20 pacjentów (43%) stwierdzono umiarkowany wzrost liczby leukocytów, w przedziale od 10 000-20 000/ $\mu$ l. Najliczniejszą grupę stanowili pacjenci charakteryzujący się liczbą leukocytów powyżej 20 000/ $\mu$ l (n = 22, 48%). Niedokrwistość stwierdzono u 7% chorych (n = 3). Małopłytkowość obserwowano u 11% pacjentów (n = 5).

Pacjenci zgłaszali się najczęściej z niskim stopniem zaawansowania PBL wg Binnetta (54%) i pośrednim stadium klinicznym wg Rai (43%). Powiększenie śledziny stwierdzono w połowie przypadków, a wątroby u 28% chorych. Limfadenopatię obserwowano u 74% pacjentów.

Analizując badane parametry biochemiczne: stężenie  $\beta_2$  mikroglobuliny, aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) stwierdzono przekroczenie ich normy odpowiednio u 30 i 24% chorych.

W badaniach parametrów immunofenotypowych, spośród 46 chorych dodatnią ekspresję antygenów CD38, CD49d, CD11c i CD54 (powyżej 30% ekspresji oznaczanej w populacji komórek białaczkowych CD5+19+) wykryto u odpowiednio: 37, 30, 33 i 70% pacjentów. Dodatnią ekspresję ZAP-70 stwierdzono u 65% chorych.

Spośród aberracji cytogenetycznych badanych metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) najczęściej występowała del(13)(q14) (39%), następnie del(11)(q22-q23) (13%), trisomia 12 (11%). Najmniejszy odsetek stanowili chorzy z del(17)(p13.1) (7%).

Tabela 3. Wyniki uzyskane w badanej grupie chorych (n = 46).

Parametry kliniczne	
Powiększenie śledziony	23 (50%)
Powiększenie wątroby	13 (28%)
Powiększenie węzłów chłonnych	34 (74%)
Stadium kliniczne wg Rai: 0/I/II/III/IV	5 (11%)/15 (33%)/20 (43%)/1 (2%)/5 (11%)
Stadium kliniczne wg Bineta: A/B/C	25 (54%)/17 (37%)/4 (9%)
Parametry hematologiczne	
Leukocyty w momencie diagnozy (G/l)	22 (6,1-183)
Hemoglobina < 11 g/dl	3 (7%)
Płytki < 100 (G/l)	5 (11%)
Parametry biochemiczne	
Stężenie $\beta_2$ mikroglobuliny > normy	14 (30%)
Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) > normy	11 (24%)
Parametry immunofenotypowe	
CD38 > 30%	17 (37%)
CD49d > 30%	14 (30%)
CD11c > 30%	15 (33%)
CD54 > 30%	32 (70%)
ZAP-70 ICCH dodatni	30 (65%)
Aberracje cytogenetyczne	
del(11q22-23)	6 (13%)
del(17p)	3 (7%)
trisomia 12	5 (11%)
del(13q14)	18 (39%)

## DYSKUSJA

Badania nad patomechanizmem przewlekłej białaczki limfocytowej oraz intensywny rozwój technik badawczych zaowocował w ostatnich latach poznaniem szeregu nowych czynników, mających znaczenie dla rozwoju i przebiegu choroby zarówno na poziomie genu i jego regulacji, jak i produktu tego genu (białka). Istotnym ograniczeniem dla przeniesienia tych metod badawczych do codziennej praktyki klinicznej jest ich pracochłonność i niezwykle wysoki koszt. Techniki immunofenotypizacji, w tym wielokolorowa cytometria przepływowa są łatwe i ogólnodostępne w codziennej praktyce klinicznej. Biorąc pod uwagę znaczną liczbę różnych parametrów, które mają znaczenie prognostyczne w PBL, istnieje uzasadniona potrzeba wypracowania optymalnego panelu czynników pozwalającego na prospektywną ocenę indywidualnej dynamiki procesu nowotworowego u chorych z PBL. W tym zakresie brane są pod uwagę czynniki kliniczne, hematologiczne, biochemiczne, immunofenotypowe, cytogenetyczne i biomolekularne.

Wierda i wsp. (22) przeprowadzili retrospektywną analizę 1674 chorych z przewlekłą białaczką limfocytową diagnozowanych i leczonych w Centrum Onkologii M.D. Anderson w Teksasie, USA. Wyodrębnili oni zmienne niezależne o charakterze prognostycznym, do których zaliczyli: wiek, płeć, stopień zaawansowania kli-

nicznego wg Rai, liczbę zajętych grup węzłowych, bezwzględną liczbę limfocytów i stężenie  $\beta_2$  mikroglobuliny w surowicy krwi. Stały się one podstawą do stworzenia indeksu prognostycznego pozwalającego szacować całkowite przeżycie chorych z PBL. Wnioski te potwierdzili w swojej pracy opublikowanej w 2011 roku Bulian i wsp. udowadniając wartość prognostyczną przytoczonych czynników na całkowite przeżycie (OS) i czas do włączenia leczenia (TTT) (23). Autorzy ci zaproponowali indeks prognostyczny obejmujący wiek, płeć, stopień zaawansowania klinicznego wg Bineta, stężenie  $\beta_2$  mikroglobuliny pomijając bezwzględną liczbę limfocytów i stopień zaawansowania wg Rai, gdyż nie potwierdziły one swojej niezależnej wartości prognostycznej.

Badani przez nas pacjenci z podejrzeniem PBL kierowani byli do Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku w Katowicach z podwyższoną liczbą leukocytów w krwi obwodowej (93% chorych), celem diagnostyki i ewentualnego leczenia. U 74% stwierdzono powiększenie węzłów chłonnych, u 50% powiększenie śledziony. Mediana wieku wyniosła 60 lat, procentowo przeważali mężczyźni. Dominowali chorzy z niskim stopniem zaawansowania wg Bineta (54%) i pośrednim stadium klinicznym wg Rai (43%). Wyniki nasze korespondują z danymi publikowanymi w literaturze. Uważa się, że mediana wieku w momencie rozpoznania PBL zwykle wynosi ok. 65 lat (3). W niektórych doniesieniach opisywane jest „odmłodzenie” badanej grupy z medianą 52 lat (8). Limfadenopatia wg literatury spotykana jest u 3/4 pacjentów, splenomegalia u połowy (3).

Stopień zaawansowania klinicznego jest najważniejszym parametrem decydującym o rozpoczęciu leczenia. Poszczególne grupy chorych różnią się znacznie medianą czasu przeżycia (powyżej 10 lat dla stadium wczesnego, 3-10 lat w stadium pośrednim i poniżej 3 lat w stopniu zaawansowanym) (2). Ograniczeniem tej klasyfikacji w odniesieniu do prognozowania przebiegu choroby jest fakt, że pomimo iż ok. 50% chorych w momencie rozpoznania PBL spełnia kryteria wczesne, to w oparciu o ten fakt nie można przewidzieć dynamiki rozwoju choroby (24). Dlatego ważnym jest moment, w którym pacjent z PBL kierowany jest do hematologa. W grupie niskiego ryzyka systematyczna obserwacja pacjenta pozwoli na uchwycenie momentu progresji choroby i optymalne podjęcie decyzji dotyczących terapii. W badanej przez nas grupie chorych z PBL częstość występowania małopłytkowości i niedokrwistości była niska i korespondowała z liczbą chorych z zaawansowanym stopniem klinicznym wg Rai i Bineta.

Parametry biochemiczne, które również należą do czynników ryzyka, są proste do oznaczenia i niskokosztowe, stanowią wartościowe uzupełnienie oceny aktywności choroby u poszczególnych chorych. Wzrost stężenia  $\beta_2$  mikroglobuliny i aktywności dehydrogenazy mleczanowej stwierdziliśmy odpowiednio u 30 i 24%. Według danych literaturowych stężenie  $\beta_2$  mikroglobuliny ma udowodnioną silną, niezależną wartość prognostyczną co do OS i TTT, wchodzi w skład indeksów prognostycznych dla PBL (22, 23). Wykazano, że jej poziom we krwi koreluje

z masą guza, stopniem nacieczenia szpiku kostnego przez komórki białaczkowe oraz ze stadium zaawansowania klinicznego choroby (25-27), a także z ekspresją parametrów fenotypowych: CD38 i ZAP-70 (28, 29). Wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej we krwi wiąże się ze skróceniem przeżycia chorych z PBL i jest powiązany z wysoką ekspresją CD38 i ZAP-70 oraz obecnością del17p w komórkach białaczkowych (30).

Z uzyskanych przez nas danych dotyczących częstości występowania parametrów immunofenotypowych o potencjalnym znaczeniu prognostycznym (ekspresja CD38, CD49d, ZAP-70 powyżej normy) wynika, że w przypadku CD38, CD49d otrzymaliśmy porównywalnie z innymi około 30% dodatnich przypadków (8, 31). Liczba pacjentów, u których stwierdziliśmy dodatnią ekspresję ZAP-70 również koresponduje z danymi literaturowymi, choć Rassenti i wsp. obserwowali tylko 46% dodatnich przypadków (8). Rozbieżności te mogą wynikać z braku standaryzacji metody oznaczania kinazy ZAP-70. Znaczenie prognostyczne ZAP-70 i CD38 jest najlepiej udokumentowane w literaturze. Podwyższona ekspresja CD38 (powyżej 30%) wiąże się ze złym rokowaniem chorych z PBL. Wzrost ekspresji ZAP-70 związany jest ze złym rokowaniem, szczególnie co do czasu wolnego od progresji (8, 9). Stwierdzono korelację pomiędzy podwyższoną ekspresją CD38 a ZAP-70 i obecnością mutacji *IgV<sub>H</sub>*. Czynniki te, jeżeli występują łącznie, mają silniejsze znaczenie rokownicze ze względu na ich związek czynnościowy (4, 10). Udowodniono również znaczenie rokownicze CD49d jako niezależnego czynnika rokowniczego dla TTT i OS (12, 32) oraz jego korelację z CD38 i cytoplazmatyczną ekspresją ZAP-70 (13).

Znaczenie rokownicze w przewlekłej białaczce limfocytowej antygenu CD54 jest niejednoznaczne. Dyskutowany jest „próg odcięcia” dla dodatniego wyniku przy oznaczaniu CD54 (19, 20, 33-35). We wcześniejszych badaniach własnych wykazaliśmy brak korelacji pomiędzy CD54 a CD38 i ZAP-70 (13). Nie stwierdziliśmy również korelacji CD11c z CD38 i ZAP-70. Okazało się natomiast, że pomimo braku korelacji aż 87% pacjentów ZAP-70 pozytywnych wykazuje obecność przynajmniej 1 z 3 wskaźników badanych metodą cytometrii przepływową (CD38, CD49d, CD11c). W grupie analizowanych chorych w przypadkach CD38(-) i równocześnie CD49d+ i/lub CD11c+ aż 90,9% pacjentów było ZAP-70 pozytywnych. Można więc przypuszczać, że markery te mogą mieć komplementarny charakter w prognozowaniu dynamiki przebiegu PBL i powinny być

włączone do panelu czynników prognostycznych.

W badanej grupie chorych obecność anomalii cytogenetycznych w badaniu metodą FISH stwierdzono u 70% pacjentów. Źródła literaturowe podają aż 80% częstość występowania zaburzeń cytogenetycznych w PBL (36-38). W badanej przez nas grupie uzyskano zbliżone wartości częstości występowania delecji o niekorzystnym znaczeniu prognostycznym: del(11) (q22-q23) – 13% i del(17) (p13.1) – 7%. Pomimo, że pacjenci ci stanowią małą grupę, to wydaje się korzystne badanie tych aberracji cytogenetycznych w celu wyselekcjonowania chorych o gorszym rokowaniu. Udowodniono, że obecność del(11q22-23), opisywana u około 10-20% chorych z PBL jest powiązana z szybką progresją choroby, obecnością masywnej limfadenopatii, złą odpowiedzią na zastosowane leczenie oraz z krótszym czasem przeżycia wynoszącym około 80 miesięcy (39, 40). Delecja 17p jest obserwowana u 8-10% chorych w momencie rozpoznania choroby oraz u około 30% pacjentów, którzy nabyli oporność na leczenie cytostatyczne. Grupę tą charakteryzuje szybka progresja objawów choroby, zła odpowiedź na leczenie analogami puryn oraz lekami alkilującymi oraz czasem przeżycia skróconym do 30 miesięcy (41-43). Stwierdzenie delecji w obrębie chromosomu 17 jest jednym ze wskazań do wdrożenia leczenia z użyciem przeszczepienia allogenicznych komórek krwiotwórczych. Z tego względu, pomimo niskiej częstości występowania tej delecji, co potwierdziliśmy również w naszych obserwacjach, badanie cytogenetyczne ma szczególną wartość kliniczną.

## WNIOSKI

1. W połowie przypadków w chwili rozpoznania przewlekłej białaczki limfocytowej stwierdza się niski stopień zaawansowania klinicznego, występują jednak zmiany narządowe (powiększenie wątroby, śledziony i węzłów chłonnych).
2. Diagnostyka przewlekłej białaczki limfocytowej obok badania podstawowych antygenów komórek PBL, powinna obejmować markery o znaczeniu prognostycznym (CD38, CD49d, ZAP-70) oznaczane metodami immunofenotypowymi, w tym wielokolorową cytometrią przepływową.
3. Pomimo niskiej częstości występowania niekorzystnych rokowniczo aberracji cytogenetycznych wykrywanych metodą FISH badanie del(17) (p13.1) i del(11) (q22-q23) powinno być włączone do panelu w momencie diagnozy.

## PIŚMIENNICTWO

1. Matutes E, Polliack A: Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000; 4: 22-47.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al.: Leukemia IWoCL. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446-5456.
3. Jamrozik K, Giannopoulos K: Przewlekłe białaczki limfocytowe. W Dmoszyńska A (red.): *Hematologia*. Wyd. I. Warszawa, Medical Tribune Polska 2011, 446-461.
4. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al.: Unmutated *IgV<sub>H</sub>* genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-1854.
5. Montillo M, Hamblin T, Hallek M et al.: Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005; 90: 391-399.

6. Wołowicz D: Czynniki rokownicze i predykcyjne w przewlekłej białaczkowej limfocytowej. *Acta Haematol Pol* 2009; 40: 209-223.
7. Palacz A, Korycka A: Diagnostyczne i rokownicze znaczenie badań cytogenetycznych w przewlekłej białaczkowej limfocytowej. *Acta Haematol Pol* 2008; 3: 433-459.
8. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ et al.: Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 1: 1923-1930.
9. Crespo M, Bosch F, Villamor N et al.: Zap-70 expression as a surrogate of immunoglobulin variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2003; 348: 1764-1775.
10. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S et al.: CD38 and ZAP-70 are functionally linked and marked CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007; 110: 4012-4021.
11. Hamblin TJ, Orchara JA, Ibbotson RE et al.: CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during course of disease. *Blood* 2002; 99: 1023-1029.
12. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI et al.: Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 865-873.
13. Krawczyk-Kuliś M, Dziaczkowska-Suszek J, Bartkowska-Chrobok A et al.: Nowe markery prognostyczne przewlekłej białaczki limfocytowej badane metodą immunofenotypizacji. *Acta Haematol Pol* 2012; 43(3): 271-276
14. Brown M, Wittwer C: Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000; 46: 1221-1229.
15. Damble RN, Wasil T, Fais F et al.: *IgV<sub>H</sub>* gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847.
16. Bairey O, Zimira Y, Rabizadeh E, Shaklai M: Expression of adhesion molecules on leukemic B cells from Chronic Lymphocytic Leukemia patients with predominant splenic manifestation. *Isr Med Assoc J* 2004; 6: 147-151.
17. Kopeć-Słęzak J: Znaczenie funkcjonalne molekuł CD (*Cluster of Differentiation*) komórek układu białokrwinkowego. *Onkol Pol* 2006; 9(3): 81-86.
18. Molica S, Dattilo A, Mannella A et al.: CD11c expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. A comparison of results obtained with different monoclonal antibodies. *Haematologica* 1994; 79: 452-455.
19. Hjalmar V, Hast R, Kimby E: Cell surface expression of CD25, CD54, and CD95 on B- and T-cells in chronic lymphocytic leukaemia in relation to trisomy 12, atypical morphology and clinical course. *Eur J Haematol* 2002; 68: 127-134.
20. Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A et al.: High CD54 cell surface expression on B cell in chronic lymphocytic leukemia is independent predictor of poor outcome. 13th Congress of the European Hematology Association, June 12-15, 2008. *Haematologica* 2008; 93. (s1): 213. Abs. 0527.
21. Slack GW, Wizniak J, Dabbagh L et al.: Flow cytometric detection of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: correlation with immunocytochemistry and Western blot analysis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 50-56.
22. Wierda WG, O'Brien S, Wang X et al.: Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4679-4685.
23. Bulian p, Tarnani M, Rossi D et al.: Multicentre validation of prognostic index for Overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* 2011; 29: 91-99.
24. Warzocha K: Indywidualne strategie terapeutyczne w przewlekłej białaczkowej limfocytowej. *Hematologia* 2010; 1, 4: 306-319.
25. Berrebi A, Bassousa L, Haran M: The significance of elevated beta 2-microglobulin(b2-m) in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Evidence of in vitro secretion following activation of CLL cells. *Leuk Res* 2010; 34: 248-249.
26. Mazur G, Wróbel T, Sowińska E et al.:  $\beta$ 2-mikroglobuliny w płynie mózgowo-rdzeniowym w ostrej białaczkowej limfoblastycznej i niezaradczym chłoniaku złośliwym o wysokim stopniu złośliwości. *Adv Clin Exp Med* 2005;14: 63-68.
27. Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P: Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1989; 81: 181-185.
28. Amin S, Parker A, Man J: ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Bioch Cell Biol* 2008; 40: 1654-1658.
29. Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, Summerfield GP: The prognostic value of CD38 expression and quantification in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymph* 2004; 45: 455-462.
30. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ et al.: Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987; 69: 929-936.
31. Shanafeld TD, Geyer SM, Bone ND et al.: CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *British Journal of Haematology* 2008; 140: 537-546.
32. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM et al.: CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 1575-1579.
33. Sulda ML, Kuss BJ, Hall RK, Bailey S et al.: The clinical utility of molecular and flow cytometric markers in CLL. *Intern Med J* 2012; 42: 137-146.
34. Jahrsdörfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE et al.: Good prognosis cytogenetics in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated in vitro with low susceptibility to apoptosis and enhanced immunogenicity. *Leukemia* 2005; 19: 759-66.
35. Zucchetto A, Sonogo P, Degan M et al.: Surface-antigen expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia: from the signature of specific disease subsets to the identification of markers with prognostic relevance. *J Transl Med* 2006; 1: 4-11.
36. Ghia P: Clues on the origin and behavior of chronic lymphocytic leukemia cells. *Hematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2008; 2: 302-307.
37. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A et al.: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-1916.
38. Montserrat E, Moreno C: Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. *Curr Opin Oncol* 2009; 21: 609-614.
39. Austen B, Skowronska A, Baker C et al.: Mutation Status of the Residual ATM Allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5448-5457.
40. Austen B, Powell JE, Alvi A et al.: Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IgV H mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005; 106: 3175-3182.
41. Monserrat E, Gine E, Bosch F: Redefining prognostic elements in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol J* 2003; 4 (Suppl. 3): 180-182
42. Dicker F, Herholz H, Schnittger S et al.: The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009; 23: 117-124.
43. Castoldi GL, Cuneo A: Karyotype of chronic lymphocytic leukemia. *Hematologia* 2003; 88 (Suppl. 10): 28-29.

otrzymano/received: 09.01.2013  
zaakceptowano/accepted: 11.02.2013

Adres/address:  
\*Joanna Dziaczkowska-Suszek  
Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
ul. Dąbrowskiego 25, 40-032 Katowice  
tel.: +48 (32) 259-12-81  
e-mail: adziaczkowska@wp.pl