

Prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie

M. Motyčková¹, P. Žák¹, V. Vroblová², C. Andrýs², D. Belada¹, J. Malý¹, L. Smolej¹

¹ Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

² Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Souhrn: Chronická lymfocytární leukemie je nejčastějším typem leukemie v západní populaci. I přes svoji vysokou incidenci zůstávala chronická lymfocytární leukemie po velmi dlouhou dobu onemocněním, které na rozdíl od jiných lymfoproliferací příliš nepoutalo pozornost. V několika posledních letech se však pohled na tuto chorobu podstatně změnil a díky intenzivnímu studiu byly získány nové poznatky v oblasti patogeneze, prognostických faktorů a v neposlední řadě také v oblasti léčby se zavedením účinných intenzivních léčebných postupů. Dnes již víme, že použití klasických prognostických faktorů je ke stanovení individuální prognózy nemocných s chronickou lymfocytární leukemií nedostatečné. Uplatněním moderních (zejména mutační stav genů pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů a cytogenetické aberace) a některých nových prognostických ukazatelů (poměr LPL/ADAM29, mikroRNA, ukazatele angiogeneze a další) je však již v době stanovení diagnózy možné rozdělit nemocné, zejména v časných klinických stádiích, do skupin významně se lišících prognózou, a předpovědět tak klinický průběh onemocnění.

Klíčová slova: chronická lymfocytární leukemie – prognostické faktory – prognóza – mutační stav IgVH – cytogenetické aberace

Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia

Summary: Chronic lymphocytic leukemia is the most common leukemia type in Western countries. Even incidence of chronic lymphocytic leukemia is high, this disease remained beyond interest for a very long time. However, in the last few years the view of this disease fundamentally changed and due to intensive study, new knowledge especially on pathogenesis, prognostic factors and therapy based on intensive therapeutic procedures were made. Today we know that usage of classical prognostic factors is insufficient for prognosis evaluation in the individuals. However modern (IgVH mutation status, cytogenetic aberrations) and new markers (LPL/ADAM29 ratio, microRNA, markers of angiogenesis etc) have potential to distinguish patients in early stages to groups with significantly different prognosis and predict clinical course of the disease.

Key words: chronic lymphocytic leukemia – prognostic factors – prognosis – IgVH mutation status – cytogenetic aberrations

Úvod

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastějším leukemickým onemocněním dospělých v euroamerické populaci [1]. Jde o lymfoproliferativní onemocnění, které dle aktuální klasifikace Světové zdravotnické organizace tvoří společnou jednotku s lymfomem z malých lymfocytů (small lymphocytic lymphoma – SLL) [2,3]. Hranice mezi diagnózou CLL a SLL je arbitrární – absolutní počet lymfocytů v periferní krvi $5 \times 10^9/l$. Hodnoty lymfocytů nad $5 \times 10^9/l$ jsou vedle typické morfologie a fenotypu buněk jedním z nutných kritérií pro stanovení diagnózy CLL [4]. Medián věku nemocných s CLL se pohybuje mezi 65 a 70 lety, necelá 1/3 pacientů je však v době stanovení diagnózy mladší 55 let, muži jsou postiženi častěji než

ženy, a to v poměru 2 : 1 [5,6]. V posledních letech byly u CLL učiněny zásadní poznatky v oblasti patogeneze a prognostických faktorů.

Změna pohledu na chronickou lymfocytární leukemii v posledních letech – několik zásadních aspektů

Zatímco dříve byla CLL považována za onemocnění starších lidí, dnes již víme, že téměř 1/3 nemocných je v době stanovení diagnózy mladší 55 let [5]. U těchto nemocných byl prokázán přínos moderních léčebných přístupů, zejména imunochemoterapie založené na purinových analogích a monoklonálních protilátkách, schopných dosáhnout kompletní remise i odstranění minimální reziduální choroby. Paliativní léčba představovaná především chlorambucilem, která byla do-

ménou do 90. let 20. století, je tak v současné době vyhrazena pouze pro nemocné, kteří vzhledem k vysokému věku, špatnému celkovému stavu či závažným přidruženým onemocněním nejsou schopni podstoupit léčbu intenzivní. Jedinou léčebnou možností skýtající reálnou šanci na vyléčení CLL je alogenní transplantace krvetvorných buněk. Ta však může být provedena pouze u vybrané skupiny mladších nemocných s nepříznivým klinickým průběhem, ale jinak ve velmi dobrém klinickém stavu [7,8].

Další pokroky v léčbě CLL se udály na poli patogeneze. Původní představa, že v patogenezi CLL hraje hlavní roli pouhá pasivní akumulace leukemických lymfocytů v G0 fázi buněčného cyklu v důsledku poruchy apoptózy, byla poopravena zjištěním, že maligní

lymfocyty CLL mají také nezanedbatelný proliferativní potenciál [9]. Množení leukemických buněk se odehrává v proliferativních centrech mízních uzlin či kostní dřeně. Populace B-lymfocytů se tak může zvýšit až o 0,35 % denně. Takové případy CLL s vystupňovanou proliferací vykazují klinicky agresivnější průběh [10,11]. Velké pokroky byly také zaznamenány při studiu prognostických faktorů. Nové prognostické faktory dnes napomáhají výrazně zpřesnit prognózu nemocných s CLL, a to včetně těch pacientů, kteří jsou diagnostikováni v časných klinických stadiích. I tito nemocní mohou totiž velmi rychle progredovat a mít agresivní průběh onemocnění.

Prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie

Chronická lymfocytární leukemie je onemocnění s mimořádně různorodým klinickým průběhem a prognózou. Zatímco někteří pacienti s CLL nevyžadují léčbu a žijí stejně dlouho jako jejich zdraví vrstevníci, jiní nemocní mají agresivní klinický průběh s časnou nutností léčby a výrazně zkráceným přežitím. Celkové přežití pacientů s CLL tak kolísá od 1–2 let po více než 25 let [10,12]. Po dlouhou dobu byly hlavními ukazateli prognózy a celkového přežití pacientů s CLL dva nezávisle vyvinuté stážovací systémy dle Raie (1975) a Bineta (1981), viz dále. Dnes je však zřejmé, že ke stanovení individuální prognózy nemocného s CLL je třeba posoudit několik hledisek. Je nutné přihlídnout k charakteristikám týkajícím se pacienta (věk, pohlaví, výkonnostní stav a přidružená onemocnění), další výpovědní hodnotu poskytují ukazatele aktivity CLL, jako je klinické stadium, rozsah nádorové masy či biologická povaha. V neposlední řadě poskytuje informace o prognóze pacienta také senzitivita k podané léčbě. Dosažení kompletní remise s negativitou minimální reziduální nemoci (MRN) je považováno za velmi důležitý prognostický ukazatel. Pacienti v kompletní remisi s MRN negativitou

mají delší období do progresu i celkové přežití než pacienti s přítomností MRN. Tento poznatek je však nutné ověřit v prospektivních studiích [10,13]. Klinické stážovací systémy jsou tedy pouze součástí komplexního hodnocení prognózy u CLL [10].

Z praktického hlediska lze prognostické faktory u CLL rozdělit do 3 skupin, a to na klasické, moderní a nové.

Klasické prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie

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

1. Stagingové systémy dle Raie a Bineta určující klinické stadium

Modifikovaná Raiova a Binetova klasifikace dělí nemocné s CLL do 3 skupin lišících se prognózou a celkovým přežitím. Pacienti ve stadiu 0 dle Raie a A dle Bineta tvoří skupinu s nízkým rizikem a nejdelším celkovým přežitím (více než 10 let). Skupinu pacientů s intermediární prognózou tvoří nemocní ve stadiu I a II dle Raie a B dle Bineta. Celkové přežití těchto nemocných je 5–7 let. Nejrizikovější skupinu s nejhorší prognózou představují nemocní ve stadiu III a IV dle Raie a C dle Bineta. Celkové přežití je v této skupině kratší než 3 roky [14,15]. Raiova i Binetova klasifikace však mají několik zásadních nedostatků.

Jedním z nich je fakt, že nemocní jsou do jednotlivých stadií řazeni pouze na základě vyšetření krevního obrazu a fyzikálního vyšetření hmatných uzlin, jater a sleziny. Zvětšení vnitřních uzlin (zejména v retroperitoneu) či splenomegalie zjištěné při použití zobrazovacích vyšetření nejsou při stážování nemocných zohledněny, neboť nebyly v době zavedení těchto stagingových systémů dostupné. Několik prací však již prokázalo, že použití počítačové tomografie (CT) mění u části nemocných původně nízká klinická stadia na po-

kročilejší, což koreluje s kratším obdobím do zahájení léčby a s horší prognózou nemocných [16]. Použití CT vyšetření po skončení léčby může také změnit původně dobré léčebné odpovědi (kompletní remise) na méně příznivé (parciální remise či stabilní onemocnění), které jsou spojeny s horší prognózou nemocných [10,17]. Nemocní, kteří dosáhli kompletní remise (CR) dle CT vyšetření, měli ve švédské studii delší trvání léčebné odpovědi v porovnání s CR hodnocenou fyzikálním vyšetřením [5]. Práce amerických autorů tyto závěry nepotvrdila [18]. To, zda u CLL zařadit zobrazovací metody do stagingu a hodnocení léčebné odpovědi, jak je tomu standardně u ostatních lymfoproliferací, je v současné době velmi diskutovanou otázkou. Předpokládá se, že revize stagingových systémů se zohledněním nálezů na zobrazovacích vyšetřeních by výrazně zpřesnila prognózu nemocných s CLL [3,5,16]. V současné době však není CT vyšetření v rámci běžné péče doporučováno ani k vstupnímu určení rozsahu onemocnění ani k hodnocení léčebné odpovědi [10,19]. Výjimkou mohou být pacienti zařazení do klinických studií či pacienti, u nichž je podezření na transformaci CLL do obrazu agresivnějšího lymfomu (Richterova transformace). Vhodnou alternativou k CT vyšetření je ultrasonografie břicha vzhledem k nízké ceně, dobré dostupnosti a absenci ionizovaného záření [19].

Další limitací klasických stagingových systémů je fakt, že není zohledněna příčina cytopenie. Nemocní by měli být zařazeni do pokročilého stadia jen v případě, kdy je anémie či trombocytopenie důsledkem infiltrace kostní dřeně CLL [20]. Pacienti s autoimunitní hemolytickou anémií, imunní trombocytopenií či čistou aplazií červené krevní řady jsou však mnohdy do pokročilých klinických stadií řazeni mylně [9,21]. Několik retrospektivních analýz navíc prokázalo, že imunitní příčina cytopenie má významně lepší prognózu (bez nepříznivého vlivu

na celkové přežití!) než cytopenie způsobené selháním kostní dřeně při infiltraci CLL [21,22].

Dalším důležitým faktem je, že přežití nemocných s CLL se může i v rámci jednoho klinického stadia výrazně lišit. Tento fakt se týká zejména nemocných v časných klinických stadiích (Rai 0–II, Binet A), kteří v současné době tvoří až 80 % nově diagnostikovaných pacientů s CLL. Dosavadní stagingové systémy však nejsou schopny identifikovat ty nemocné v časných stadiích, kteří mají vysoké riziko progresu a celkově špatnou prognózu [12]. Velkým pokrokem tedy bylo, že se začaly uplatňovat nově nalezené prognostické faktory (viz dále), které umožňují nemocné, zejména v časných stadiích, rozdělit do rizikových skupin, a tedy již v době stanovení diagnózy pomoci s posouzením rizika progresu [23]. Nové prognostické faktory tak mohou zpřesnit individuální prognózu nemocného, otázkou do budoucna zůstává i možnost načasování a přizpůsobení intenzity léčby individuálnímu riziku (tzv. risk-adapted strategies) [24]. I když v tomto ohledu klasické stagingové systémy dle Raie a Bineta selhávají, jsou pro svoji jednoduchost a snadnou reprodukovatelnost v klinické praxi stále užívány, a to nejen k orientačnímu odhadu prognózy pacienta, ale jsou i součástí kritérií pro zahájení léčby [19,25].

2. Věk, pohlaví a výkonnostní stav

Pohlaví a věk pacienta mají také svůj prognostický význam. Muži s CLL mají zpravidla agresivnější formu onemocnění a kratší přežití než ženy, tento fakt ale zůstává stále neobjasněn [26]. Věk je jako prognostický faktor u CLL spojen s určitými zvláštnostmi. Starší pacienti mají sice absolutní přežití kratší než pacienti mladší, relativní přežití mají však delší [27]. Věk není v současné době zahrnut do kritérií pro zahájení léčby, je nutné jej však, stejně jako celkový výkonnostní stav, vždy zohlednit, neboť zejména u starších nemocných významně stoupá výskyt přidružených onemocnění, která mohou

bránit použití razantnějších léčebných postupů.

3. Ukazatele proliferativní aktivity onemocnění, sérové markery

Jednoduchým markerem proliferace u CLL je tzv. zdvojovací čas lymfocytů (lymphocyte doubling time – LDT). Jde o časový úsek, za který dojde k nárůstu lymfocytů v periferní krvi o dvojnásobek původní hodnoty [15]. Montserrat et al poprvé popsali význam LDT pro predikci celkového přežití. Zdvojovací čas lymfocytů kratší než 12 měsíců je u časných stadií (Rai 0–II, Binet A) spojen s horší prognózou a kratším přežitím. Pokud je naopak LDT delší než 12 měsíců, onemocnění má příznivější průběh [28]. Zdvojovací čas lymfocytů nižší než 6 měsíců či nárůst absolutního počtu lymfocytů o 50 % za dobu kratší 2 měsíců patří mezi kritéria zahájení léčby [19,20].

Mezi další ukazatele aktivity CLL lze zařadit skupinu sérových markerů. Jde zejména o laktátdehydrogenázu (LDH), β_2 -mikroglobulin (β_2 M), solubilní CD23, CD27 a CD44, sérovou tymidinkinázu (TK) a některé interleukiny. Zvýšené hodnoty těchto markerů často korelují s agresivnějším průběhem onemocnění a s ostatními nepříznivými faktory, kterým bude věnována pozornost v další kapitole (viz moderní a nové prognostické faktory) [29]. Mnohdy je však obtížné nálezy interpretovat vzhledem k použití rozdílných, nestandardizovaných metod detekce, problémem v mnohých studiích je také stanovení rozdílné hranice („cut-off“) pro zvýšené hodnoty [15].

Zvýšená hladina LDH je u CLL spojena s kratším celkovým přežitím, častějším výskytem delece 17p, s pozitivitou zeta-asociovaného proteinu o molekulové hmotnosti 70 kDa (ZAP-70) a CD38 [29]. Zvýšená koncentrace β_2 M u CLL koreluje s pokročilým klinickým stavem, velkou lymfadenopatií, významnou infiltrací kostní dřeně, pozitivitou ZAP-70 a CD38 [29,30]. V některých studiích byla jeho vysoká koncentrace spojena i se zvýšením so-

lubilního CD23 [31]. Dvě prospektivní studie ukázaly, že solubilní forma CD23 v séru koreluje s horší prognózou včetně pacientů v časném stadiu A dle Bineta [14]. Sérová tymidinkináza je enzym nezbytný pro syntézu DNA, u pacientů s CLL je považována za důležitý marker proliferace a koreluje s pokročilým klinickým stadiem a rychlejší progresí onemocnění pacientů v časných stadiích CLL. Jako ukazatel aktivity onemocnění je TK používána zejména německou CLL skupinou [32,33].

V klinické praxi se v podmínkách České republiky rutinně vyšetřuje sérový β_2 M a LDH, eventuálně TK, vyšetření ostatních sérových ukazatelů je výzkumnou záležitostí.

4. Typ infiltrace kostní dřeně

V současné době není nutné ke stanovení diagnózy CLL cytologické ani histologické vyšetření kostní dřeně. Histologické vyšetření kostní dřeně a určení typu infiltrace (difúzní vs nedifúzní typ) bylo dříve považováno za důležitý prognostický faktor. Difúzní infiltrace dřeně CLL buňkami je spojena s horší prognózou a agresivnějším klinickým průběhem [34]. Prognostický význam typu infiltrace kostní dřeně však může být nahrazen moderními prognostickými ukazateli [15]. V současné době je toto vyšetření vyhrazeno zejména pro pacienty zařazené do klinických studií či v rámci diferenciální diagnostiky závažných cytopenií.

Moderní prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie

Objev několika tzv. moderních prognostických faktorů u CLL umožnil získat daleko přesnější informaci o biologickém chování onemocnění a pomohl i upřesnit individuální prognózu nemocných s CLL. Nejvýznamnějšími z této skupiny jsou cytogenetické abnormality, mutační stav genů pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů (IgVH), exprese ZAP-70 a exprese povrchového znaku CD38 na buňkách CLL [14].

1. Cytogenetické aberace

Pro chronickou lymfocytární leukemii je ve většině případů typická přítomnost klonálních chromozomálních změn v B lymfocytech. Klasické cytogenetické vyšetření je u CLL méně výtečné (40–50 %) pro velice nízkou mitotickou aktivitu leukemických lymfocytů in vitro a možné falešně pozitivní výsledky způsobené zachytem aberací v příměsi nenádorových T lymfocytů [12,35]. Pokrokem v detekci cytogenetických změn bylo zavedení metody fluorescenční hybridizace in situ (FISH), kterou lze zjistit přítomnost cytogenetických aberací až v 80 % případů a která se v současné době stala nezastupitelnou rutinní metodikou u pacientů s CLL [1]. Nejvýznamnějšími nálezy u CLL jsou delece dlouhého ramene 13. chromozomu (del 13q14), trisomie 12, delece části dlouhého ramene 11. chromozomu (del 11q) a delece krátkého ramene 17. chromozomu (del 17p13). Ostatní chromozomové změny mají u CLL spíše omezený význam (např. delece 6q) [36]. Jednou ze stěžejních prací týkajících se problematiky cytogenetických aberací u CLL byla studie publikovaná v roce 2000 Döhnerem et al. Pomocí FISH zjišťovali aberace u 325 pacientů s CLL. Určili četnost jejich výskytu a nálezy korelovali s klinickými parametry a průběhem onemocnění. Na základě cytogenetických nálezů definovali 5 skupin lišících se statisticky významně celkovým přežitím. Nejdelší celkové přežití, a tedy nejlepší prognózu měli nemocní s izolovanou delecí 13q14 (celkové přežití 133 měsíců); do skupiny s nejkratším přežitím, a tedy nejhorší prognózou patřili nemocní s izolovanou delecí 17p13 (celkové přežití 32 měsíců). Tito nemocní měli také nejkratší interval do zahájení léčby [37]. V současné době lze na základě cytogenetických aberací určit 3 prognostické skupiny. První představuje skupinu příznivých aberací zahrnující nemocné s normálním karyotypem a izolovanou del 13q14, do skupiny s nepříznivou prognózou patří nemocní

s del 11q a del 17p13 [13]. Nemocní s trisomií 12 mají intermediární prognózu – některé studie ji sice řadí do skupiny nepříznivých aberací, jiné toto tvrzení nepotvrdily. V průběhu onemocnění se mohou objevovat nové cytogenetické aberace, hovoří se o tzv. klonální evoluci. Zejména přítomnost nové del 11q a/nebo del 17p13 významně zhoršuje prognózu nemocného. Vyšetření cytogenetických abnormalit metodou FISH se proto doporučuje nejen v době stanovení diagnózy, a zejména před zahájením léčby, ale i v případě klinické progresy onemocnění či před léčbou další linie [15,35]. Vzhledem k náročnosti a vysoké ceně by se však toto vyšetření mělo provádět pouze u pacientů mladších, v jinak celkově dobrém klinickém stavu a před zahájením léčby intenzivní, nikoli paliativní.

Jednotlivé cytogenetické nálezy mají svoje specifika.

Delece 13q14 je nejčastější aberací s výskytem vyšším než 50 % [14]. U této delece zatím nebyl objeven konkrétní nádorový supresorový gen, který by pomohl objasnit patogenezi onemocnění. Pozornost je věnována nálezu dvou mikroRNA genů (miR-15a a miR-16-1) lokalizovaných v oblasti 13q14. Zdá se, že ztráta či snížení exprese těchto genů má vliv na regulaci exprese hlavního anti-apoptického proteinu Bcl-2. Zvýšená exprese Bcl-2 má pravděpodobně vliv na zvýšenou rezistenci buněk vůči pro-apoptickým stimulům a vede k delšímu přežívání buněk CLL [20,38]. Pacienti s izolovanou delecí 13q14 mají nejdelší přežití a excelentní prognózu v porovnání s ostatními aberacemi [9,10].

Trisomie 12 je druhou nejčastější chromozomální změnou u CLL s výskytem mezi 10 a 25 %. Ani u této změny nebyl nalezen konkrétní gen vysvětlující patogenezi onemocnění. Buňky CLL s trisomií 12 mají atypickou morfologii a častěji nemutované IgVH geny (viz dále); zajímavým zjištěním je vysoká exprese CD20 u této aberace, což je důležité pro léčbu antiCD20 monoklonálními protilátkami [20,29,39].

Delece 11q se vyskytuje v 10–20 % a spolu s del 17p13 je považována za vysoce nepříznivý nález. Na úrovni DNA je zasažen gen ATM (ataxia telangiectasia mutated), který hraje důležitou úlohu v signální dráze hlavního pro-apoptického proteinu p53. Kináza ATM reaguje na poškození buněčné DNA a prostřednictvím fosforylace stabilizuje p53. Narušení této signální dráhy vede k poruše apoptózy buněk CLL. Ukazuje se, že na rozdíl od p53 je k uplatnění nepříznivého efektu nutná bialelická ztráta ATM [40]. Klinicky je del 11q typicky spojena s predominancí u mužů a častým nálezem masivní lymfadenopatie [14,20]. Výsledky studie CLL-8 však ukazují, že použití razantní imunochemoterapie může nepříznivý vliv delece 11q alespoň částečně setřít [41].

Nejméně příznivým cytogenetickým nálezem u pacientů s CLL je delece krátkého ramene 17. chromozomu (del 17p13). Její výskyt u neléčených pacientů je kolem 5 %, u léčených pacientů se v důsledku klonální evoluce může zvýšit až na 30 % [20]. Tato změna je spojena se ztrátou funkce nejvýznamnějšího nádorového supresorového genu p53 (TP53), který sehrává nezastupitelnou úlohu v případě poškození buněčné DNA, kdy za normálních okolností dochází k zastavě buněčného cyklu v G1, G2 fázi a opravě poškozeného genomu, či nastartování signální cesty vedoucí k apoptóze. Gen TP53 kódující protein p53 je u CLL nejčastěji poškozen právě delecí 17p13 v kombinaci s mutací druhé alely (kompletní inaktivace genu; bialelické abnormality), ale vyskytují se i samostatné delece a mutace (monoalelické abnormality). Již vyřazení jedné alely delecí vede k porušené funkci proteinu p53. Bylo prokázáno, že stejnou výpovědní hodnotu jako delece mají i samotné mutace TP53 (blíže viz nové prognostické faktory) [40,42]. Pacienti s del 17p13 a/nebo mutací TP53 mají nejhorší prognózu s nejkratším celkovým přežitím [40]. Jedním z hlavních důvodů je

fakt, že účinek většiny protinádorových léků spočívá v indukci apoptózy prostřednictvím signální dráhy p53, která je u pacientů s del 17p13 či mutací TP53 narušena [15,40]. Slibnou léčbu u těchto nemocných představují léky působící nezávisle na dráze p53 jako monoklonální antiCD52 protilátka alemtuzumab, vysoké dávky kortikoidů či flavopiridol [25,43,44]. U těchto pacientů by také mělo být časně zváženo provedení alogenní transplantace kostní dřeně či periferních kmenových buněk, které, jak se zdá, negativní prognostický význam del 17p13 či mutace TP53 stírá [45]. Přítomnost del 17p13 se tak v současné době stává jediným moderním prognostickým faktorem, ke kterému je vhodné přihlídnout při volbě léčebné strategie [20].

2. Mutační stav genů pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů

Tyto geny jsou fyziologicky hypermutovány u normálních B-lymfocytů po setkání s antigenem v zárodečném centru lymfatické uzliny [1]. Dříve se předpokládalo, že B lymfocyty u CLL jsou buňky, které neprošly zárodečným centrem lymfatického folikulu a odpovídají tzv. naivním B lymfocytům. Dnes víme, že u asi 1/2 pacientů s CLL mají leukemické lymfocyty hypermutované IgVH geny, což by odpovídalo paměťovým buňkám, které prošly zárodečným centrem uzliny [13]. Velká studie hodnotící profil genové exprese u CLL však naznačuje, že i lymfocyty s nemutovanými IgVH geny mají profil odpovídající paměťovým buňkám [46]. Mutované IgVH geny mají dle definice více než 2% rozdíl vůči sekvenci odpovídající zárodečné linii. Hranice 98 % homologie („cut off“) je v současné době považována za nejvhodnější [29,47]. V roce 1999 byl dvěma nezávislými skupinami prokázán prognostický význam mutačního IgVH stavu, dle kterého jsou nemocní s CLL rozděleni do 2 skupin významně se lišících prognózou. Nemocní s nemutovanými IgVH geny mají agresivnější formu onemocnění, častěji vyžadují terapii a mají vý-

znamně kratší celkové přežití než nemocní s mutovanými IgVH geny, kteří mají zpravidla stabilní formu onemocnění [48,49]. Zajímavým zjištěním byl fakt, že tento závěr platí i pro nemocné v časných klinických stadiích (A dle Bineta), u kterých se předpokládalo, že mají příznivou prognózu v porovnání s nemocnými ve stadiích pokročilých. Tento nálezný jen potvrdil, že klinický staging dle Raie a Bineta není k určení individuální prognózy nemocných, zejména v časných stadiích, dostačující a že mutační stav IgVH genů a klinický staging jsou dva nezávislé prognostické ukazatele [50]. Důležitou výjimkou a také samostatným prognostickým ukazatelem je přítomnost VH3-21 genu, která značí nepříznivou prognózu nezávisle na mutačním stavu [12]. Velká pozornost byla věnována korelaci mutačního IgVH stavu s ostatními prognostickými faktory včetně cytogenetických změn. I když se u pacientů s nemutovanými IgVH geny častěji vyskytují nepříznivé cytogenetické aberace jako del 17p a del 11q, a naopak pacienti s mutovanými IgVH geny mají častěji del 13q či normální karyotyp, tento rozdíl není významný a dnes víme, že IgVH mutační stav a cytogenetické aberace jsou nezávislými prognostickými faktory [1,13]. Vzhledem k technické náročnosti a nákladnosti stanovení IgVH [proces o řadě kroků zahrnující reverzní transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakci (RT-PCR) s nutností sekvenace PCR produktů] byla před několika lety věnována pozornost hledání tzv. zástupných prognostických faktorů, které by co nejlépe korelovaly s IgVH, ale jejichž stanovení by bylo snadnější. Nadějnými se zdála být exprese ZAP-70 a CD38 (viz dále). Mnoho dalších studií poté ale prokázalo diskordanci mezi mutačním stavem IgVH, ZAP-70 a CD38, které jsou nyní považovány za nezávislé prognostické faktory. Stanovení mutačního stavu se však v současné době stalo dostupnějším a spolu s vyšetřením cytogenetických abnormalit je běžně používáno k posou-

zení prognózy u mladších nemocných s nově diagnostikovanou CLL [29].

3. Exprese CD38

CD38 je povrchový transmembránový glykoprotein s enzymatickou i receptorovou funkcí. Po navázání ligandu dojde k nitrobuněčné signalizaci následované zvýšenou expresí hlavního anti-apoptického proteinu Bcl-2. Damle et al porovnávali expresi znaku CD38 na povrchu buněk CLL průtokovou cytometrií s klinickým průběhem a IgVH stavem. Exprese vyšší než 30 % korelovala s nemutovanými IgVH geny (ve více než 92 %) a agresivním klinickým průběhem, nízká exprese byla naopak spojena s mutovanými IgVH geny a delším celkovým přežitím [49]. I v několika dalších studiích byla korelace CD38 a mutačního stavu potvrzena, a CD38 se tak zdál být nadějným zástupným markerem mutačního stavu [15]. Záhy bylo ale zjištěno, že exprese CD38 se může v průběhu onemocnění měnit, velkým problémem byla také rozdílná hranice pro určení positivity CD38 (5 % vs 7 % vs 20 % vs 30 %) [10]. Dnes jsou mutační stav IgVH a exprese CD38 považovány za nezávislé prognostické faktory [20,51]. Vyšší exprese CD38 však zůstává důležitým negativním ukazatelem aktivity onemocnění, vyšetření CD38 pomocí průtokové cytometrie může sloužit k upřesnění individuální prognózy nemocných s CLL [24].

4. Exprese ZAP-70

Zeta-asociovaný protein o molekulové hmotnosti 70 kDa (ZAP-70) je cytoplazmatická molekula patřící do rodiny tyrozinových kináz Syk. Fyziologicky je exprimován T lymfocyty a NK buňkami, dle nových poznatků také v nízkých koncentracích aktivovanými B lymfocyty periferní krve, tonzil či sleziny [15]. Za normálních okolností je ZAP-70 aktivován zeta podjednotkou T lymfocytárního receptoru s následným spuštěním signálních nitrobuněčných drah nezbytných pro aktivaci T lymfocytů. U CLL k aktivaci

ZAP-70 vede signální dráha z membránového receptoru B lymfocytů. ZAP-70 je navíc funkčně propojen se systémem CD38. ZAP-70/CD38 pozitivní lymfocyty mají zvýšenou tendenci k migraci do výhodného mikroprostředí po stimulaci CXCL12 (významný chemoatraktant pro T lymfocyty). V signální dráze CD31/CD38/ZAP-70 se tedy zřejmě spojují proliferací a migrační signály. Zvýšenou migraci a proliferaci lze vysvětlit agresivnější klinický průběh u ZAP-70 pozitivních nemocných [47]. Expres ZAP-70 byla u CLL objevena na základě studia genového expresního profilu pomocí DNA mikročipů u skupiny IgVH mutovaných a nemutovaných pacientů v době, kdy bylo hledání zástupných faktorů pro mutační stav IgVH výrazně v popředí zájmu. Studie překvapivě zjistila, že genový profil obou těchto skupin pacientů je velice podobný a odpovídá paměťovému B lymfocytům, přesto ale odhalila skupinu více než 100 odlišných genů, z nichž měl největší rozdíl v expresi právě gen pro ZAP-70. Většina pacientů s nemutovanými IgVH geny byla ZAP-70 pozitivní, pacienti s mutovanými geny byli převážně ZAP-70 negativní, a měli tedy lepší prognózu [46]. Zdálo se, že ZAP-70 by se mohl stát zástupným faktorem mutačního IgVH stavu nejen pro vysoký stupeň konkordance, ale také pro méně náročný způsob stanovení flow cytometricky. Za ZAP-70 pozitivní případy jsou považovány ty, u kterých je pozitivních více než 20 % buněk [47]. Další studie však ukázaly, že ani v případě ZAP-70 není jeho korelace s mutačním IgVH stavem pravidlem a že až v 7–29 % případů existuje diskordance [9]. Krober et al publikovali zajímavou studii velkého souboru pacientů (148 pacientů), kde rozdíl mezi expresí ZAP-70 a mutačním stavem závisel na přítomnosti dalších negativních prognostických ukazatelů jako del 17p, del 11q a VH3-21. Téměř u všech nemocných se ZAP-70 pozitivitou a mutovanými IgVH geny byla prokázána přítomnost genu VH3-21, která

je samostatným negativním prognostickým ukazatelem nezávislým na mutačním stavu. Pacienti ZAP-70 negativní s nemutovanými IgVH geny měli ve většině případů zachyceny nepříznivé cytogenetické aberace (del 17p či del 11q) [52]. Jiné studie tuto souvislost ale nepotvrdily [20]. Jednu ze stěžejních prací týkajících se prognostické výpovědní hodnoty ZAP-70 publikoval Del Principe et al na souboru 289 pacientů. V ní koreloval nález exprese ZAP-70, CD38 a mutačního stavu IgVH s klinickým průběhem onemocnění. Nemocné rozdělil do 3 prognosticky odlišných skupin. Pacienti s negativitou ZAP-70 i CD38 a mutovanými IgVH geny tvořili skupinu s nejprůběžnější prognózou se statisticky významně nejdelším obdobím do progresu (progression-free survival – PFS) i celkovým přežitím (overall survival – OS). Nejkratší PFS a OS měli naopak nemocní s pozitivitou ZAP-70 i CD38 a nemutovanými IgVH geny. Pacienti s diskordancí těchto znaků měli intermediární prognózu, kde důležitější roli než CD38 a mutační stav sehrávala exprese ZAP-70: pacienti ZAP-70 pozitivní, i pokud byli CD38 negativní s mutovanými IgVH geny, měli významně kratší PFS než nemocní ZAP-70 negativní s pozitivní expresí CD38 a nemutovanými IgVH geny [53]. Zdálo se tedy, že exprese ZAP-70 má větší výpovědní hodnotu než mutační stav IgVH. Tento nález však musí být potvrzen v prospektivních studiích. Při interpretaci výsledků exprese ZAP-70 je také nutné přihlídnout k některým specifikům. Některé práce nově prokázaly, že se i exprese ZAP-70, stejně jako exprese CD38, může v průběhu onemocnění u části nemocných měnit [54]. Zásadním problémem je nestandardizovaná metodika vyšetření průtokovou cytometrií (používání různých klonů protilátek či různých fluorochromů) a nutnost rychlého zpracování vzorku [15,29]. Dnes tedy víme, že expresi ZAP-70 nelze považovat za zástupný prognostický faktor mutačního stavu IgVH, ale je vhodné jej stejně tak jako

expresi CD38 použít jako důležitý doplňující nepříznivý prognostický ukazatel k upřesnění individuálního rizika pacienta s CLL [13].

Nové prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie

I přes znalost moderních prognostických faktorů se u CLL dále hledají nové ukazatele, které by měly silnější prognostickou hodnotu, nebo by byly schopny lépe určit klinický průběh či např. předpovědět rezistenci na léčbu. Studium některých z nich přineslo nový pohled na biologii CLL s určitými léčebnými důsledky. Mezi tyto tzv. nové prognostické faktory u CLL můžeme zařadit expresi lipoproteinové lipázy (LPL) a poměr LPL/ADAM29, expresi dalších genů jako CLLU1, AID či LAG-3, expresi HLA-G molekuly, expresi CD49d, objev mikroRNA genů, ukazatele angiogeneze a délku telomer a telomerázovou aktivitu. Diskutovanou problematikou jsou také mutace TP53. Většina těchto ukazatelů však vyžaduje potvrzení jejich prognostického významu v dalších studiích [29].

1. Lipoproteinová lipáza a poměr LPL/ADAM29

Lipoproteinová lipáza je enzym, který se za normálních okolností nachází v tukové tkáni, svaích, makrofázích a NK buňkách, u nichž moduluje jejich cytotoxickou aktivitu. Normálně není zjistitelná v T a B lymfocytech. Lipoproteinová lipáza sehrává důležitou úlohu v metabolismu lipidů, mutace LPL genu jsou spojeny s dyslipidemií a rozvojem aterosklerózy. Význam exprese LPL lymfocyty CLL zůstává nejasný, pravděpodobně sehrává důležitou úlohu v jejich aktivaci. Gen *LPL* u CLL byl objeven na základě studia expresního genového profilu u IgVH mutovaných a nemutovaných pacientů (stejně jako např. gen pro ZAP-70) a byl zjištěn vysoký stupeň shody mezi expresí LPL a mutačním IgVH stavem [55,56]. U pacientů s nemutovanými IgVH geny je exprese LPL významně vyšší v porovnání s mutovanými IgVH geny, jak po-

prvé popsaly práce německé a francouzské CLL skupiny v roce 2005. Další studie poté potvrdily, že vysoká exprese LPL mRNA měřená kvantitativní RT-PCR v mononukleárních buňkách periferní krve koreluje s IgVH mutačním stavem až v 84 % případů a kromě mutačního stavu je také spojena s vysokou expresí ZAP-70, CD38, cytogenetickými aberacemi, krátkým LDT, pokročilejším klinickým stadiem, kratším obdobím do zahájení léčby, kratším celkovým přežitím, a tedy horší prognózou nemocných. Proč je však exprese LPL u IgVH nemutovaných CLL vysoká, není dosud známo. Zdá se, že v průběhu onemocnění zůstává stabilní [15,29,55,56].

ADAM29 (a desintegrin and metalloproteinase domain 29) je dalším genem, jehož exprese se také liší mezi IgVH mutovanými a nemutovanými případy [12]. Představuje gen kódující transmembránové proteiny sehrávající roli v četných buněčných interakcích. Na rozdíl od ostatních genů patřících do rodiny ADAM, které jsou exprimovány v rozličných tkáních, se ADAM29 za normálních okolností nachází pouze v buňkách testes. Stejně jako LPL i ADAM29 jsou na rozdíl od normálních B lymfocytů vysoce exprimovány maligními B lymfocyty CLL. Úloha ADAM29 v patogenezi CLL však zůstává také nejasná. Oppezo et al jako první publikovali prognostický význam kombinované exprese – poměru LPL/ADAM29. Jde o další negativní prognostický faktor s vysokou korelací s mutačním IgVH stavem (92 %). Vysoká exprese LPL/ADAM29 měřená RT-PCR byla zjištěna u nemutovaných IgVH pacientů a spolu s pozitivitou ZAP-70 byla spojena s významně kratším obdobím bez události (EFS – event-free survival) v celé skupině nemocných a u pacientů v klinickém stadiu A dle Bineta. U pacientů ve stadiích Binet B a C se poměr LPL/ADAM29 stal nezávislým nepříznivým prognostickým faktorem určujícím přežití na rozdíl od exprese ZAP-70 [56].

2. Exprese dalších genů u chronické lymfocytární leukemie

Na základě studia expresního genomického profilu byly u CLL identifikovány další geny, jejichž exprese je spojena s nepříznivým průběhem onemocnění. Takovým genem je např. *CCLU1* (CLL upregulated gene1), první pro CLL specifický gen lokalizovaný na chromozomu 12q22, jehož funkce zatím zůstává nejasná [57]. Několik prací prokázalo, že vysoká exprese *CCLU1* je spojena s významně kratším obdobím do zahájení léčby a kratším celkovým přežitím [58]. Tento nálezn byl v jedné práci statisticky významný pouze pro pacienty mladší 70 let, u starších nemocných se rozdíl stíral. Zdá se, exprese *CCLU1* je asociována se ZAP-70 a CD38 pozitivitou a nepříznivými cytogenetickými aberacemi. Mutační stav IgVH a exprese *CCLU1* jsou pravděpodobně nezávislými prognostickými faktory [57,58].

Jako nepříznivý prognostický marker se ukazuje vysoká exprese genu *AID* (activation-induced cytidine deaminase) nezbytného pro somatické hypermutace, která koreluje s nemutovanými IgVH geny, nepříznivými chromozomálními změnami, krátkým LDT, vysokým LDH a vysokou expresí CD38 [10,29].

Dalším nepříznivým prognostickým ukazatelem u CLL se zdá být vysoká exprese genu *LAG3* (lymphocyte-activation gene 3), která je spojena s nemutovanými IgVH geny a kratším obdobím do zahájení léčby [59].

3. Exprese molekuly HLA-G

Molekula HLA-G (human leukocyte antigen G) patří k neklasickým molekulám komplexu HLA I. třídy. Za normálních okolností má tkáňově omezenou distribuci a nachází se pouze na buňkách trofoblastu. Exprese HLA-G je spojena s významným imunosupresivním účinkem (inhibice migrace NK buněk, indukce apoptózy T-lymfocytů atd.). Nádorové buňky s ektopickou HLA-G expresí tak mohou být chráněny před protinádorovým působením

imunitního systému. Povrchová exprese HLA-G molekuly flow cytometricky byla vedle řady solidních tumorů, T a B lymfomů prokázána i u CLL. Skupina pacientů s CLL s vysokou expresí (více než 23 % HLA-G pozitivních buněk) měla významně kratší období do progresu (PFS) i období do zahájení léčby než pacienti s expresí nízkou. S vysokou HLA-G expresí byly také spojeny poruchy buněčné i humorální imunity [29,60]. Nedávná studie na velkém počtu pacientů s CLL však tato zjištění nepotvrdila, exprese HLA-G na buňkách CLL byla nízká a nijak nekorelovala s PFS [61]. Role povrchové exprese HLA-G jako prognostického faktoru u CLL zůstává tedy nejasná, k objasnění jejího významu jsou třeba další studie.

4. Exprese CD49d

CD49d je molekula, kterou lze pomocí průtokové cytometrie zjistit na buňkách CLL. Tento integrin je zapojen do procesu migrace CLL buněk do lymfoidních tkání a usnadňuje interakce maligních lymfocytů se stromálními buňkami, což snižuje apoptický potenciál leukemických buněk. Zdá se, že vysoká exprese CD49d koreluje s kratším obdobím do zahájení léčby a kratším celkovým přežitím a že je nezávislým negativním prognostickým faktorem. Význam stanovení této molekuly spočívá kromě prognostického významu také v tom, že v současné době je již v rámci klinických studií zkoušena monoklonální antiCD49d protilátka (natalizumab) [62,63].

5. Význam mikroRNA u chronické lymfocytární leukemie

MikroRNA (miRNA) jsou malé RNA molekuly, které působí jako post-transkripční regulátory genové exprese a mají důležité funkce v buněčné proliferaci, diferenciaci a apoptóze [64]. V buňce vznikají transkripcí miR genů z DNA a následným sestřihem primárního transkriptu. Jeho dalším enzymatickým štěpením v cytoplasmě vzniká molekula mikroRNA, která se váže

k cílové mRNA. Ta poté není translována nebo je degradována, a tak dochází k regulaci množství proteinu kódovaného příslušnou mRNA [29,64]. U CLL byly nejdříve popsány 2 miRNA, a to miR-15a a miR-16-1, nacházející se v oblasti 13q14, která bývá u pacientů s CLL často deletována. Ztráta či snížení exprese těchto miRNA vede ke zvýšení hladiny důležitého anti-apoptického proteinu Bcl-2, a tím ke snížení citlivosti CLL buněk vůči pro-apoptickým stimulům. V pokusech in vitro vedla naopak správná funkce miR-15a a miR-16-1 k významnému poklesu hladiny Bcl-2 a nastartování apoptózy nádorových buněk; tyto miRNA mají tedy funkci tumor supresorových molekul. Do budoucna se tak nabízí možnost léčebného využití těchto poznatků o miRNA u nádorů s vysokou expresí Bcl-2 [20,38]. Další studie poté u CLL odhalily skupinu dalších 13 miRNA, jejichž exprese souvisí s moderními prognostickými faktory (IgVH mutační stav, ZAP-70, cytogenetické aberace) a progresí onemocnění [29]. Kromě miR-15a a miR-16-1 jsou poměrně dobře prozkoumány miR-34a, miR-29c a miR-17-5p, jejichž snížená exprese byla popsána u pacientů s delecí 17p13 či mutací TP53, tedy u nemocných s nepříznivou prognózou. Např. miR-34a je transkripčně aktivována p53; del 17p/mutace TP53 vede ke snížení její exprese, a tím ke zvýšené hladině Bcl-2, která je miR-34a regulována. Funkci tumor supresorových molekul mají za normálních okolností i miR-29a, miR-29b a miR-181, které regulují Tcl-1 proto-onkogen. Vysoká exprese Tcl-1 je v pokusech spojena s rozvojem CLL, koreluje s agresivním průběhem CLL, pozitivitou ZAP-70 a nemutovanými IgVH geny [64]. Studium mikroRNA by mohlo přinést další důležité informace o patogenezi a prognóze CLL.

6. Angiogeneze u chronické lymfocytární leukemie

Angiogeneze je novotvorba cév z již existující vaskulatury. Hraje význam-

nou roli u solidních tumorů, kde zásadně přispívá k metastatickému rozsevu [65]. V 90. letech 20. století začal intenzivní výzkum angiogeneze i u hematologických malignit a bylo zjištěno, že i v případě CLL hraje angiogeneze důležitou úlohu v patogenezi onemocnění [66]. V séru či plazmě pacientů s CLL byly nalezeny zvýšené koncentrace angiogenních faktorů produkovaných maligními lymfocyty, a to zejména cévní endotelový růstový faktor (VEGF) a bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF). Vyšší hladiny těchto proangiogenních cytokinů jsou spojeny s pokročilým klinickým stadiem, časnou progresí CLL a horší odpovědí na léčbu fludarabinem [1,15]. Některé práce prokázaly, že hladiny VEGF i bFGF klesají po intenzivní léčbě CLL [66]. Dalším zajímavým nálezem je vedle produkce angiogenních faktorů také exprese pro ně určených receptorů CLL buňkami. Tak je zajištěna i autokrinní stimulace novotvorby cév [1,67]. Kromě membránové formy receptorů byly v séru pacientů s CLL zjištěny také solubilní receptory pro VEGF [68]. Korelace zvýšené hladiny sérových angiogenních faktorů s ostatními prognostickými ukazateli (mutační stav IgVH, cytogenetické abnormality, CD38 a ZAP-70 exprese) není dosud zcela jasná, výsledky jednotlivých studií se liší. Limitací v mnohých z nich může být nízký počet hodnocených pacientů či rozdíly v použitých metodikách [1,69]. Klasickým ukazatelem abnormální angiogeneze u CLL je kromě zvýšených koncentrací angiogenních faktorů také zvýšená mikrovaskulární denzita v kostní dřeni (MDV, počet kapilár na zorné pole či plochu histologického preparátu kostní dřene) [68]. Zvýšená MDV byla prokázána i u pacientů s CLL v časných stadiích; je spojena s horší prognózou nemocných [70]. Některé studie však zvýšenou MDV ve dřeni u CLL nepotvrdily. Příčinou nejednoznačných výsledků studií může být nedostatečný počet pacientů či rozdílné použité metodiky hodno-

cení. Je tedy třeba dalších, prospektivních studií k objasnění významu vaskularity dřeně v patogenezi CLL [68]. Výzkum angiogeneze u CLL je cenný nejen z prognostického, ale také z léčebného hlediska. V současné době jsou již k dispozici data o použití nových léčiv s antiangiogenním působením, jako jsou thalidomid či lenalidomid, antiangiogenní účinek mají také některá klasická cytostatika [66].

7. Délka telomer a telomerázová aktivita u chronické lymfocytární leukemie

Telomery jsou koncové části chromozomů, které se zkracují při každém buněčném dělení. Ribonukleotidový komplex telomeráza je enzym pracující jako reverzní transkriptáza, který zajišťuje doplňování 3'-konců chromozomální deoxyribonukleotidové kyseliny (DNA), je tedy schopen telomery prodlužovat. Za normálních okolností se telomeráza uplatňuje pouze v dělících se zárodečných buňkách či nediferencovaných buňkách (např. hematopoetické buňky kostní dřene). V ostatních tělních buňkách je naopak její funkce blokována a každý cyklus replikace DNA je spojen se zkrácením chromozomů, které nakonec může vést až ke ztrátě schopnosti telomer maskovat konce chromozomů a odlišit je od neopravených zlomů. To má za následek aktivaci odpovědi na poškození DNA, která způsobí zastavení buněčného cyklu.

Vysoká aktivita telomerázy byla zjištěna i v nádorových buňkách, což umožňuje jejich mnohonásobné dělení [29,71]. Také u CLL bylo zjištěno, že zkrácení telomer a vysoká aktivita telomerázy jsou spojeny s horší prognózou a kratším celkovým přežitím. Zdá se, že tento nález také koreluje s nemutovanými IgVH geny, pozitivitou CD38 a ZAP-70. Vzhledem k vysoké aktivitě telomerázy u některých případů CLL s agresivním průběhem se do budoucna nabízí i možnost léčebného využití inhibitorů telomerázy [20,29,72].

8. Význam mutací TP53 u chronické lymfocytární leukemie

Jak již bylo řečeno, nejméně příznivým cytogenetickým nálezem u pacientů s CLL je delece krátkého ramene 17. chromozomu (del 17p13) spojená se ztrátou funkce nádorového supresorového genu p53 (TP53), kódujícího protein p53 [20,40]. Častěji než samotná delece 17p13 vede k poškození funkce TP53 delece v kombinaci s mutací druhé alely (kompletní inaktivace genu). Bylo ale prokázáno, že stejnou výpovědní hodnotu jako samostatné delece či jejich kombinace s mutací mají i samostatné mutace TP53, které nejsou zachytitelné metodou FISH. Zdá se také, že samostatné mutace se u pacientů s CLL vyskytují významně častěji než samostatné delece [40]. Nepříznivý vliv samotných mutací TP53 nezávisle na přítomnosti del 17p13 prokázala nedávná práce italských autorů. U velkého souboru pacientů potvrdili, že samostatná mutace TP53 má, stejně tak jako del 17p13 či kombinace del 17p13/mutace TP53, negativní vliv na celkové přežití a období do zahájení léčby a přináší s sebou rezistenci k fludarabinovým režimům. Nejčastěji se vyskytovaly mutace TP53 v exonu 5–8 (ve více než 95 %) z celkově vyšetřovaných exonů 2–10, v ostatních exonech byl výskyt mutací nízký [42]. Ke stejnému závěru dospěla i analýza pacientů zařazených do studie CLL-8. I zde bylo potvrzeno, že výskyt samostatných mutací TP53 nezávisle na přítomnosti del 17p13 je spojen s nižším procentem celkových léčebných odpovědí, kratším obdobím do progresu a kratším celkovým přežitím. U pacientů s mutací TP53 nebyl statisticky významný rozdíl v těchto parametrech ve skupinách léčených režimem FC (fludarabin + cyklofosfamid) a FCR (FC + rituximab) [73]. I mnohé další práce prokázaly jednoznačný negativní vliv samostatných mutací TP53 na období do zahájení léčby, celkové přežití i odpovědi na léčbu. Dále bylo prokázáno, že u léčených pacientů (chemoterapie i imunochemoterapie) s původně neporušenou dráhou p53 se objevují nové abnormality TP53, zejména nové mutace TP53. Mutace TP53 se nacházejí v tzv. oblasti DNA vázajících domén, naprostá většina z nich jsou „missense mutace“ (mutace vedoucí k záměně aminokyseliny), menší část tvoří „frame shift mutace“ (mutace vedoucí k posunu čtecího rámce) [40,74,75].

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

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

Závěr

Na poli výzkumu chronické lymfocytární leukemie se v posledních letech objevilo několik nových poznatků týkajících se patogeneze, léčby a v neposlední řadě také prognostických faktorů. Klasické prognostické faktory zůstávají důležitým základem pro hodnocení prognózy, avšak nové ukazatele mohou přispět k přesnějšímu zhodnocení prognózy pacienta s CLL již v době stanovení diagnózy. Otázkou do budoucna zůstává také možnost co nejlépe načasovat a přizpůsobit intenzitu léčby individuálnímu riziku nemocného právě na základě znalosti těchto nových prognostických faktorů. Z tohoto hlediska má dominantní postavení nepříznivá cytogenetická aberace del 17p, jejíž přítomnost může v některých případech ovlivnit výběr cíleného léčebného postupu. Nález ostatních nepříznivých faktorů, ať už dalších cytogenetických změn, nemutovaných IgVH genů či vysoká exprese CD38 a ZAP-70, tvoří důležité doplňující informace o prognóze nemocných. Je nutné zdůraznit, že žádný z moderních či nových prognostických faktorů sám o sobě není důvodem k zahájení léčby. Pro zahájení léčby u pacientů s CLL je

nadále dle aktuálních kritérií NCI-WG z roku 2008 rozhodující aktivita choroby. To, zda a kdy by měla být léčba zahájena na základě určení negativních prognostických faktorů zejména u pacientů v časných klinických stadiích a zda by nemocní z včasného zahájení léčby profitovali, je otázkou, kterou se zabývají klinické prospektivní studie a na kterou v současné době dosud nemáme jednoznačnou odpověď.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR.

Literatura

1. Vroblová V, Smolej L, Vrbáček F et al. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2009; 52: 3–8.
2. Kluin PM, Ko YH, Kovrigina AM et al. World Health Organisation Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 4th ed. Lyon: Agency for Research on Cancer 2008.
3. Zent CS, Polliack A. Staging chronic lymphocytic leukemia (CLL) for prognosis at diagnosis. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 2433–2434.
4. Klabusay M, Hrabčáková V, Stehlíková O et al. Role průtokové cytometrie v diagnostice a sledování pacientů s chronickou lymfocytární leukemií. *Transfúze Hematol Dnes* 2010; 16: 45–51.
5. Norin S, Kimby E, Lundin J. Tumor burden status evaluated by computed tomography scan is of prognostic importance in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol* 2010; 27: 820–825.
6. Goldin LR, Landgren O, Marti GE et al. Familial Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia, Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL), and Related Lymphomas. *European J Clin Med Oncol* 2010; 2: 119–126.
7. Paneesha S, Milligan DW. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 128: 145–152.
8. Smolej L. Modern concept in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology* 2009; 14: 249–254.
9. Krejčí M, Adam Z, Pour L et al. Chronická B lymfatická leukemie a jí podobné stavy. *Vnitř Lék* 2009; 55: 746–765.
10. Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008; 22: 211–219.
11. Gine E, Martinez A, Villamor N et al. Retraction: Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia

- (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 2010; 95: 1620.
12. Gentile M, Mauro FR, Guarini A et al. New developments in the diagnosis, prognosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 597–604.
 13. Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 279–284.
 14. Wagner SD, Cwynarski K. Chronic lymphocytic leukaemia: new biological markers for assessing prognosis. *Hematol J* 2004; 5: 197–201.
 15. Kozák T. Prognostické faktory chronické lymfocytární leukemie. *Transfuzie Hematol Dnes* 2010; 16: 56–61.
 16. Muntanola A, Bosch F, Arguis P et al. Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1576–1580.
 17. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G et al. German CLL Study Group. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 885–891.
 18. Blum KA, Young D, Broering S et al. Computed tomography scans do not improve the predictive power of 1996 national cancer institute sponsored working group chronic lymphocytic leukemia response criteria. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5624–5629.
 19. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. 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.
 20. Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 455–468.
 21. Zent CS, Ding W, Schwager SM et al. The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 615–621.
 22. Kyasa MJ, Parrish RS, Schichman SA et al. Autoimmune cytopenia does not predict poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 74: 1–8.
 23. 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.
 24. Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A et al. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2006; 17: 683–690.
 25. Wierda W. New prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2009; 7: 32–33.
 26. Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1477–1480.
 27. Molica S, Brugiatelli M, Callea V et al. Comparison of younger versus older B-cell chronic lymphocytic leukemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. *Eur J Haematol* 1994; 52: 216–221.
 28. Montserrat E, Sanchez-Bisno J, Viñolas N et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62: 567–575.
 29. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev* 2009; 23: 25–47.
 30. Gentile M, Cutrona G, Neri A et al. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica* 2009; 94: 887–888.
 31. Molica S, Levato D, Cascavilla N et al. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD 23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999; 62: 117–122.
 32. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 1732–1737.
 33. Hallek M, Wanders L, Ostwald M et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996; 22: 439–447.
 34. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM et al. Bone marrow histologic pattern-the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 1984; 64: 642–648.
 35. Berková A, Michalová K. Cytogenetické nálezy u chronické lymfocytární leukemie (CLL). *Transfuzie Hematol Dnes* 2010; 16: 52–55.
 36. Zenz T, Döhner H, Stilgenbauer S. Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 439–453.
 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. Jankovičová K, Krejsek J, Kopecký O et al. Hodnocení apoptózy buněk akutní myeloidní leukemie a B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie po kultivaci s cytostatiky a její vztah k mnohočetné rezistenci. *Vnitř Lék* 2005; 51: 175–182.
 39. Tam CS, Otero-Palacios J, Abruzzo LV et al. Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol* 2008; 141: 36–40.
 40. Malčíková J, Pospíšilová Š, Mayer J et al. Význam nádorového supresoru p53 u chronické lymfocytární leukemie. *Transfuzie Hematol Dnes* 2010; 16 (Suppl): 29–32.
 41. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G et al. International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376: 1164–1174.
 42. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 995–1004.
 43. Lin TS, Ruppert AS, Johnson AJ et al. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6012–6018.
 44. Doubek M, Jungová A, Brejcha M et al. Alemtuzumab v terapii chronické lymfocytární leukemie: retrospektivní analýza a hodnocení léčebné odpovědi podle cytogenetického rizika. *Vnitř Lék* 2009; 55: 549–554.
 45. Schetelig J, van Biezen A, Brand R et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion: a retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation analysis. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5094–5100.
 46. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639–1647.
 47. Smolej L, Saudková M, Špaček et al. ZAP-70 u chronické B-lymfocytární leukemie: klinický význam a metody detekce. *Vnitř Lék* 2006; 52: 1194–1199.
 48. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al. Unmutated Ig V(H) genes are associ-

- ated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848–1854.
49. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840–1847.
50. Vasconcelos Y, Davi F, Levy V et al. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3928–3932.
51. Kröber A, Seiler T, Benner A et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1410–1416.
52. Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 969–975.
53. Del Principe MI, Del Poeta G, Bucisano F et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 108: 853–861.
54. Vroblova V, Vrbacky F, Hrudkova M et al. Significant change in ZAP-70 expression during the course of chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2010; 84: 513–517.
55. Nüchel H, Hüttmann A, Klein-Hitpass L et al. Lipoprotein lipase expression is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1053–1061.
56. Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C et al. French Cooperative Group on CLL. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 650–657.
57. Josefsson P, Geisler CH, Leffers H et al. CLLU1 expression analysis adds prognostic information to risk prediction in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4973–4979.
58. Buhl AM, Jurlander J, Geisler CH et al. CLLU1 expression levels predict time to initiation of therapy and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2006; 76: 455–464.
59. Kotaskova J, Tichy B, Trbusek M et al. High expression of lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) in chronic lymphocytic leukemia cells is associated with unmutated immunoglobulin variable heavy chain region (IGHV) gene and reduced treatment-free survival. *J Mol Diagn* 2010; 12: 328–334.
60. Nüchel H, Rebmann V, Dürig J et al. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 105: 1694–1698.
61. Perez-Chacon G, Rosado S, Rebolledo N et al. Prognostic irrelevance of HLA-G in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* 2009; 31: 327–337.
62. Majid A, Lin TT, Best G et al. CD49d is an independent prognostic marker that is associated with CXCR4 expression in CLL. *Leuk Res* 2010 Nov 17. [Epub ahead of print]
63. Nüchel H, Switala M, Collins CH et al. High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Immunol* 2009; 131: 472–480.
64. Mráz M, Pospíšilová Š, Mayer J. MicroRNA v patogenezi chronické lymfocytární leukemie a jejich prognostický význam. *Transfúze Hematol Dnes* 2010; 16: 33–35.
65. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29 (6 Suppl 16): 15–18.
66. Smolej L, Andrys C, Krejsek J et al. Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a cévní endotelový růstový faktor (VEGF) jsou zvýšeny v plazmě periferní krve nemocných s chronickou lymfocytární leukemií a klesají po intenzivní léčbě obsahující fludarabin. *Vnitř Lék* 2007; 53: 1171–1176.
67. Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res* 2004; 28: 243–248.
68. Smolej L. Význam mikroprostředí u chronické lymfocytární leukemie. *Transfúze Hematol Dnes* 2010; 16: 24–28.
69. Smolej L, Andrys C, Peková S et al. Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgVH mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 1432–1433.
70. Molica S, Cutrona G, Vitelli G et al. Markers of increased angiogenesis and their correlation with biological parameters identifying high-risk patients in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2007; 31: 1575–1578.
71. Hájek R, Kunická Z, Skleničková M et al. Stanovení aktivity telomerázy u mnohočetného myelomu. *Klin Onkol* 2005; 18: 80–83.
72. Brezinova J, Berkova A, Vcelikova S et al. Telomere length, molecular cytogenetic findings, and immunophenotypic features in previously untreated patients with B-chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 2010; 57: 215–221.
73. Zenz T, Hoth P, Busch R et al. TP53 Mutations and Outcome After Fludarabine and Cyclophosphamide (FC) or FC Plus Rituximab (FCR) in the CLL8 Trial of the GCLLSG. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2009; 114: Abstract 1267.
74. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009; 114: 5307–5314.
75. Zenz T, Kröber A, Scherer K et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008; 112: 3322–3329.

MUDr. Monika Motyčková

www.fnhk.cz

e-mail: hrudkovamonika@seznam.cz

Doručeno do redakce: 14. 3. 2011

Přijato po recenzi: 13. 4. 2011

www.klinickaonkologie.cz