

Hodnocení vybraných ukazatelů apoptózy a angiogeneze u chronické lymfocytární leukemie

M. Motyčková¹, L. Smolej¹, C. Andrys², V. Řezáčová², V. Řeháček³, M. Šimkovič¹, D. Belada¹, P. Žák¹

¹ IV. interní hematologická klinika Lékařské fakulty a FN Hradec Králové, přednosta doc. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

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

³ Transfuzní oddělení Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prim. MUDr. Vít Řeháček

Souhrn: Úvod: Jedním z hlavních trendů u chronické lymfocytární leukemie (CLL) se v posledních letech stalo hledání nových prognostických faktorů umožňujících zpřesnit prognózu, a předpovědět tak klinický průběh onemocnění již v době stanovení diagnózy s možností načasování a přizpůsobení intenzity léčby individuálnímu riziku nemocného. *Pacienti a metody, cíle práce:* Cílem naší práce bylo zhodnocení prognostického významu vybraných ukazatelů apoptózy a angiogeneze: byly měřeny sérové koncentrace tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α) a transformujícího růstového faktoru β -1 (TGF- β 1) metodou ELISA a exprese receptoru typu II pro TGF- β (TGF β RII) a receptoru typu 2 pro fibroblastový růstový faktor (FGFR2) průtokovou cytometrií na lymfocytech periferní krve u 75 neléčených pacientů s CLL (47 mužů a 28 žen, medián věku 65 let, rozmezí 38–82 let). *Výsledky:* Sérové koncentrace TNF- α byly významně vyšší u nemocných s CLL v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,0001$) a byly spojeny s nepříznivou prognózou: významně vyšší TNF- α měli nemocní s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým i středním rizikem ($p = 0,0008$, resp. $p = 0,0097$), nemocní s vysokou hodnotou sérového β 2-mikroglobulinu ($p = 0,045$), masivní lymfadenopatií ($p = 0,0083$), nemutovanými geny pro variabilní části těžkých řetězců imunoglobulinů ($p = 0,041$) a nepříznivými cytogenetickými aberacemi ($p = 0,0014$). Nemocní s progresí CLL měli významně vyšší hodnoty TNF- α než nemocní se stabilním průběhem ($p = 0,0009$) a období do zahájení léčby bylo významně kratší u pacientů s vyššími koncentracemi TNF- α ($p = 0,0049$). Zvýšené koncentrace TGF- β 1 byly naopak spojeny s příznivou prognózou: významně vyšší TGF- β 1 byl zjištěn u nemocných s nízkým rizikem dle Raie v porovnání s vysokým rizikem ($p = 0,011$), u nemocných bez masivní lymfadenopatie ($p = 0,041$), s mutovanými IgVH geny ($p = 0,012$) a negativitou ZAP-70 (zeta-asociovaný protein o 70 kilodaltonech) ($p = 0,044$). Nemocní s progresující chorobou měli významně nižší hodnoty TGF- β 1 než nemocní se stabilním onemocněním ($p = 0,0014$). Období do zahájení léčby bylo významně delší u nemocných s vyšším TGF- β 1 ($p = 0,016$). U nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým rizikem byla zjištěna významně nižší exprese TGF β RII ($p = 0,022$). Prognostický význam exprese FGFR2 nebyl prokázán. Statisticky významnými a nezávislými prognostickými faktory pro celkové přežití byly zvýšené sérové koncentrace TNF- α a masivní lymfadenopatie ($p = 0,036$, resp. $p = 0,047$). *Závěr:* Další výzkum TNF- α a TGF- β je cenný nejen z prognostického, ale také léčebného hlediska, neboť signální dráhy těchto cytokinů by se mohly stát terapeutickým cílem u nemocných s CLL.

Klíčová slova: chronická lymfocytární leukemie – prognóza – TNF- α – TGF- β 1 – TGF β RII – FGFR2 – apoptóza – angiogeneze

Assessment of selected markers of apoptosis and angiogenesis in chronic lymphocytic leukemia

Summary: *Introduction:* Search for new prognostic markers in order to improve prognostic accuracy and predict clinical outcome at the time of diagnosis has recently become one of the major trends in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Patients and methods, aim of study:* The aim of our study was assessment of selected markers of apoptosis and angiogenesis and their potential as new prognostic factors. We evaluated serum levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay; furthermore, we quantified expression of type II receptor for transforming growth factor beta (TGF- β RII) and type 2 receptor for fibroblast growth factor-2 (FGFR2) on CLL cells using flow cytometry analysis in 75 previously untreated patients with CLL (47 males and 28 females, median age, 65 years, range 38–82) and healthy donors. *Results:* We found significantly elevated TNF- α in patients with CLL compared to the control group ($p < 0.0001$); high expression of TNF- α was associated with unfavourable prognosis: significantly higher concentrations were found in patients with Rai high-risk group compared to low and intermediate-risk group ($p = 0.0008$ and $p = 0.0097$), with high serum β 2-microglobulin ($p = 0.045$), massive lymphadenopathy ($p = 0.0083$), unmutated genes for variable region of immunoglobulin heavy chain (IgVH) ($p = 0.041$) and unfavourable cytogenetic aberrations ($p = 0.0014$). In addition, patients with progressive CLL had significantly higher TNF- α than those with stable clinical course ($p = 0.0009$); time to treatment was significantly shorter in patients with higher TNF- α ($p = 0.0049$). Higher TGF- β 1 concentrations were associated with favourable subgroups: with Rai low-risk group compared to high-risk group ($p = 0.011$), patients without massive lymphadenopathy ($p = 0.041$), patients with mutated IgVH ($p = 0.012$) and ZAP-70 negativity (zeta-associated protein of 70 kilodaltons) ($p = 0.044$). Patients with progressive CLL had significantly lower TGF- β 1 levels than those with stable course ($p = 0.0014$) and time to treatment was significantly longer in patients with higher TGF- β 1 ($p = 0.016$). Patients with Rai high-risk group had significantly lower TGF β RII expression than those with low-risk group ($p = 0.022$). The prognostic significance of FGFR2 was not found. Significant and independent prognostic factors for overall survival were high serum concentrations of TNF- α and massive lymphadenopathy ($p = 0.036$, resp. $p = 0.047$). *Conclusion:* Based on our results, TNF- α and TGF- β 1 possess prognostic significance in CLL; further research in this direction may also be important therapeutically, because these signal pathways could serve as possible treatment targets.

Key words: chronic lymphocytic leukemia – prognosis – TNF- α – TGF- β 1 – TGF β RII – FGFR2 – apoptosis – angiogenesis

Úvod

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastějším leukemickým onemocněním dospělých v euroamerické populaci s velmi variabilním klinickým průběhem [1]. V posledních letech se pohled na CLL zásadně změnil a pozornost se soustředila vedle použití intenzivní immunochemoterapie a některých nových léčiv zejména na studium prognostických faktorů.

Významnou roli v patogenezi CLL sehrává signální dráha **nukleárního faktoru kappa B** (NF- κ B), jejíž stálá aktivace je jedním z hlavních mechanismů, který u CLL vede ke zvýšení metabolismu buněk, jejich proliferaci a v neposlední řadě také umocňuje nevímavost leukemických buněk vůči apoptóze, čímž zvyšuje jejich přežívání [2–4]. Jako ukazatel míry aktivace dráhy NF- κ B jsme zvolili sérovou koncentraci **TNF- α** , který je NF- κ B pozitivně transkripčně regulován. B-lymfocyty u CLL konstitutivně a spontánně produkují TNF- α a jeho zvýšené hladiny lze u pacientů s CLL v séru/plazmě detekovat [5–10]. U pacientů s CLL byla zjištěna exprese receptorů pro TNF- α na maligních B-lymfocytech, receptory byly nalezeny také v séru [11]. I když je biologický efekt TNF- α různorodý, většina prací prokázala, že u CLL převažuje jeho funkce anti-apoptotická a že působí jako autokrinní růstový faktor pro maligní B-lymfocyty [7,10–12]. Ve většině studií jsou vyšší sérové/plazmatické koncentrace TNF- α spojovány s nepříznivou prognózou včetně kratšího období do zahájení léčby (time to treatment – TTT) i celkového přežití (overall survival – OS) (ve studii Ferrajoliové et al byl vyšší TNF- α nezávislým faktorem pro OS včetně nemocných ve stadiích 0–II dle Raie) [7,13–15].

Transformující růstový faktor β (TGF- β) patří do rodiny TGF- β proteinů; dosud bylo nalezeno 6 typů specifických povrchových buněčných receptorů zprostředkujících funkci těchto proteinů. Stěžejní jsou vysokoafinní typ I a typ II receptorů (TGF β RI a TGF β RII). Funkcí TGF- β

proteinů je zejména kontrola buněčné proliferace (na většinu buněk má antiproliferativní účinek), diferenciace, migrace a apoptózy (sníženou expresí Bcl-2 a Bcl-X_L potencuje apoptózu). Úlohu hrají i v imunitních dějích, kde působí převážně imunosupresivně, čímž inhibují protinádorové imunitní mechanismy [10,16–19]. Transformující růstový faktor β je také důležitým aktivátorem angiogeneze, vede k sekreci hlavních angiogenních faktorů, a to fibroblastového růstového faktoru-2 (FGF-2) a cévního endotelového růstového faktoru (VEGF) [20,21]. TGF- β je intenzivně studován v souvislosti s rozvojem některých solidních nádorů i hematologických malignit. I v patogenezi CLL hraje signální dráha TGF- β důležitou roli [17,20]. Jeho úloha je však kontroverzní – u většiny pacientů s CLL přispívá autokrinní produkce TGF- β k útlumu proliferace maligních B-lymfocytů (zejména v časnějších stadiích), pomalejší progresi a indolentnímu průběhu onemocnění. Některé práce potvrdily tuto teorii nálezem významně nižších hladin TGF- β u pacientů v pokročilých stadiích CLL [22–24]. Asi 1/3 pacientů s CLL je však (i v případech vysoké sekrece TGF- β) vůči anti-proliferativnímu a pro-apoptotickému působení TGF- β odolná [10,24,25]. Hlavní mechanismus odolnosti vůči TGF- β u CLL spočívá v patologii receptorů TGF β R na leukemických buňkách [17,23,25–27]. Genetické defekty TGF β RI či TGF β RII vedou ke snížení či ztrátě jejich exprese či k funkčním poruchám v TGF β R signalizaci navzdory normální expresi receptoru [20,25,27]. Ztráta citlivosti vůči působení TGF- β tak může přispívat k progresi a agresivnějšímu průběhu CLL [25,28,29].

Fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2, dříve označován jako bazický fibroblastový růstový faktor – bFGF) je protein, jehož hlavní funkcí je úloha mitogenní, která není specifická pouze pro endotelie (jedná se o 1 z nejdůležitějších aktivátorů angiogeneze), ale působí také na fibroblasty nebo epite-

liální buňky. Na maligní lymfocyty CLL působí anti-apoptoticky [23,30–32]. Funkce FGF-2 se uplatňuje po vazbě na vysokoafinní transmembránové receptory (existují 4 typy – FGFR1–4), kdy dochází k aktivaci intracelulární části receptorů s funkcí tyrozin-kinázy a spuštění nitro-buněčné signalizace [30,33]. V séru či plazmě pacientů s CLL byly nalezeny zvýšené koncentrace FGF-2 i VEGF [23,31,34–38]. Dalším důležitým nálezem je vedle produkce angiogenních faktorů také exprese pro ně určených receptorů CLL buňkami, čímž je zajištěna i autokrinní stimulace novotvorby cév. Zatím byla u CLL jednoznačně ověřena exprese receptorů pro VEGF včetně jejich solubilní formy [39,40]. K dispozici je však velmi omezené množství prací zkoumajících expresi FGFR na leukemických buňkách CLL [41–43]. Zatím nejrozsáhlejší publikací týkající se problematiky exprese FGFR konkrétně u CLL je práce Krejčí. Krejčí et al prokázali expresi všech 4 typů FGFR na leukemických CLL-lymfocytech, nejsilněji (ve 100 % případů) byl exprimován typ FGFR1IIIc, velmi slabě naopak FGFR3IIb a oba typy FGFR2 (IIb i IIc) [42]. Vyšší koncentrace FGF-2 a VEGF jsou spojeny s pokročilým klinickým stadiem, časnou progresí CLL a horší odpovědí na léčbu fludarabinem [1,23,32,37,38,40]. Některé práce ukázaly, že cirkulující FGF-2 a TGF- β klesají po intenzivní léčbě purinovými analogy [35,36].

Cílem naší práce bylo:

1. stanovení vybraných ukazatelů apoptózy a angiogeneze,
2. zhodnocení jejich vztahu k prognostickým faktorům,
3. zhodnocení souvislosti ukazatelů apoptózy a angiogeneze s klinickým průběhem onemocnění – celkovým přežitím (OS) a obdobím do zahájení léčby 1. linie (TTT).

Pacienti a metody

Do studie bylo zařazeno 75 nemocných s chronickou lymfocytární leukemií diagnostikovaných na IV. interní hematologické klinice FN Hradec Krá-

lové od ledna roku 2007 do srpna roku 2010. Před vstupem do studie podepsali všichni nemocní informovaný souhlas a studie byla provedena dle zásad Helsinské deklarace. Žádný z nemocných nebyl v době odběru zjišťovaných ukazatelů léčen. Diagnóza CLL vyžadovala splnění diagnostických kritérií dle mezinárodních doporučení NCI-WG z roku 2008. Dle těchto doporučení byla v našem souboru také definována progredující (aktivní) choroba (s nutností zahájení léčby), ostatní případy byly označeny jako stabilní onemocnění [44].

Základní charakteristiky nemocných jsou uvedeny v tab. 1.

Do souboru bylo zařazeno 47 mužů (63 %) a 28 žen (37 %) s věkovým mediánem 65 let (rozmezí 38–82 let) v době odběru vybraných ukazatelů. Nízké/střední/vysoké riziko dle modifikovaného Raiova stagingu (stadium 0/I a II/III a IV) bylo přítomno u 30/31/14 nemocných (40/41/19 %) [45]. Sérová koncentrace laktátdehydrogenázy (LDH) byla vyšetřena u 71/75 (95 %) nemocných, u 46 pacientů (65 %) byla zvýšena nad horní hranici normy (3,75 μ kat/l). β_2 -mikroglobulin (B2M) byl vyšetřen u 45/75 (60 %) pacientů, u 36 z nich (80 %) byla jeho hladina zvýšena nad horní hranici normy (1,8 μ mol/l). Medián absolutního počtu lymfocytů v periferní krvi (ALC) v době zařazení do studie byl $38,79 \times 10^9/l$ (rozmezí 5×10^9 – $620,7 \times 10^9/l$). Mutační stav genů pro variabilní část těžkých řetězců imunoglobulinů (IgVH) byl vyšetřen z nesrážlivé periferní krve reverzně transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) s následnou sekvenací PCR produktů. Mutované IgVH geny měly více než 2 % rozdíl vůči sekvenci odpovídající zárodečné linii. K dispozici bylo hodnocení IgVH u 65/75 (87 %) nemocných. Dvacet šest pacientů (40 %) mělo mutované geny pro IgVH, 39 (60 %) mělo nemutované geny. Přítomnost cytogenetických aberací byla stanovena pomocí fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

Tab. 1. Deskriptivní charakteristiky nemocných.

celkový počet nemocných	75
muži/ženy	47/28 (63/37 %)
medián věku (rozmezí)	65 let (38–82)
nízké riziko (Rai 0)	30/75 (40 %)
střední riziko (Rai I, II)	31/75 (41 %)
vysoké riziko (Rai III/IV)	14/75 (19 %)
progredující onemocnění	36/75 (48 %)
sérová LDH zvýšená	46/71 (65 %)
sérový B2M zvýšený	36/45 (80 %)
medián ALC (rozmezí)	$38,79 \times 10^9/l$ (rozmezí 5×10^9 – $620,7 \times 10^9/l$)
masivní lymfadenopatie (> 5 cm)	16/75 (21 %)
nemutované IgVH geny	39/65 (60 %)
nepříznivé cytogenetické aberace dle FISH	21/68 (31 %)
exprese ZAP-70 pozitivní	18/72 (25 %)
exprese CD38 pozitivní	19/72 (26 %)

LDH – laktátdehydrogenáza, B2M – β_2 -mikroglobulin, ALC – absolutní počet lymfocytů, IgVH – mutační stav genů kódujících variabilní části těžkých řetězců imunoglobulinů, ZAP-70 – zeta-asociovaný protein o 70 kilodaltonech, FISH – fluorescenční hybridizace *in situ*

u 68/75 nemocných (91 %) a hodnocena dle Döehnerovy hierarchické klasifikace [46]. Delece dlouhého ramene 13. chromozomu (del 13q14) byla nalezena u 19/68 nemocných (28 %), trisomie 12 u 12/68 (18 %), delece části dlouhého ramene 11. chromozomu (del 11q) u 16/68, (24 %) a delece krátkého ramene 17. chromozomu (del 17p13) u 5/68 nemocných (7 %). Šestnáct nemocných (16/68, 23 %) nemělo zachyceny žádné změny. Nemocní byli dle cytogenetického nálezu rozděleni do 2 rizikových skupin. Ve skupině s nízkým rizikem a příznivější prognózou byli nemocní s normálním nálezem, izolovanou del 13q14 a trisomií 12 (47/68, 69 %), do skupiny s nepříznivou prognózou patřili nemocní s nálezem del 11q a del 17p13 (21/68, 31 %). Expres ZAP-70 byla hodnocena průtokovou cytometrií z periferní krve a za pozitivní považována, pokud byla vyšší než 30 %. Byla vyšetřena u 72/75 nemocných (96 %) a pozitivní byla v 19 případech (26 %). Expres ZAP-70 (zeta-asociovaný protein o molekulové hmotnosti 70 kDa) byla též hodnocena průto-

kovou cytometrií z periferní krve (za použití monoklonální protilátky značené fykoerytrinem klonu 1E7.2 firmy Caltag, USA), a jako ZAP-70 pozitivní případy byly považovány ty, kde bylo pozitivních více než 20 % buněk. Osmnáct nemocných ze 72 hodnocených (25 %) bylo ZAP-70 pozitivních. U 36/75 (48 %) pacientů bylo provedeno ultrasonografické vyšetření uzlin a/nebo břicha. Paket uzlin v průměru 5 a více cm (masivní lymfadenopatie; tzv. bulk) byl v době zařazení do studie diagnostikován u 16 nemocných (16/75, 21 %), u 14 z nich (85 %) byl lokalizován nitrobřišně a zjištěn dle UZ vyšetření.

Způsob stanovení vybraných ukazatelů

Odběry krve ke zhodnocení vybraných ukazatelů byly provedeny buď v době stanovení diagnózy CLL (50/75, 67 %), nebo kdykoliv v průběhu onemocnění, které vykazovalo v době odběru stabilní průběh bez známek progresu (25/75, 33 %). Medián od data stanovení diagnózy do data provedení odběru byl 16,4 měsíce (rozmezí 0,3–132 měsíců).

Tab. 2. Přehled nejdůležitějších nálezů v našem souboru – deskriptivní statistika.

Vyšetřované kazatele	n	Medián	Průměr	s	95% IS průměru	p
TNF-α CLL	75	2,83	5,79	9,65	1,75–4,0	< 0,0001
TNF-α kontroly	57	1,37	1,32	0,52	1,31–1,42	
TNF-α Rai nízké	30	1,69	3,32	3,94	1,42–2,97	p = 0,0008
TNF-α Rai vysoké	14	7,52	12,78	18,14	3,3–15,03	
TNF-α Rai střední	31	2,83	5,02	6,54	1,67–5,22	p = 0,0097
TNF-α Rai vysoké	14	7,52	12,78	18,14	3,3–15,03	
TNF-α B2M zvýšený	36	3,7	8,21	13,04	1,95–8,07	p = 0,045
TNF-α B2M normální	9	1,54	3,33	4,83	1,09–4,88	
TNF-α masivní lymfadenopatie	16	7,00	8,68	8,37	3,3–13,15	p = 0,0083
TNF-α bez masivní lymfadenop.	59	1,88	5,00	9,89	1,62–3,20	
TNF-α IgVH nemutované	39	4,88	5,96	5,12	4,28–7,64	p = 0,041
TNF-α IgVH mutované	26	1,86	5,23	14,01	0,43–10,89	
TNF-α cytogenetika nepříznivá	21	7,17	8,82	8,06	5,15–12,49	p = 0,0014
TNF-α cytogenetika příznivá	47	1,83	3,26	3,39	2,27–4,26	
TNF-α progredující	36	5,48	8,75	12,92	2,97–8,17	p = 0,0009
TNF-α stabilní	39	1,68	3,05	3,424	1,42–2,83	
TGF-β1 Rai nízké	30	48 735	56 510	29 280	42 660–62 300	p = 0,011
TGF-β Rai vysoké	14	19 450	33 101	24 084,7	13 119,3–58 900	
TGF-β1 masivní lymfadenopatie	16	30 116	35 625	21 261,4	18 765–51 030	p = 0,041
TGF-β1 bez masivní lymfadenopatie	59	46 170	51 018	28 134,5	39 100–54 600	
TGF-β1 IgVH nemutované	39	39 100	41 771	23 488,1	28 350–50 760	p = 0,012
TGF-β1 IgVH mutované	26	51 350	59 100	30 439,1	44 280–69 660	
TGF-β1 ZAP-70 negativní	54	47 115	51 535	27 689,9	39 100–52 650	p = 0,044
TGF-β1 ZAP-70 pozitivní	18	33 960	38 272	25 089,6	16 510,5–45 360	
TGF-β1 progredující	36	31 860	38 177	25 313,5	19 793,7–46 170	p = 0,0014
TGF-β1 stabilní	39	49 140	56 556	26 617,5	41 310–65 070	
TGFβRII Rai nízké	30	2,69	5,24	6,43	1,08–5,68	p = 0,022
TGFβRII Rai vysoké	14	0,83	1,91	3,08	0,21–2,84	
FGFR2 CLL	75	1,46	5,45	12,9	0,86–2,12	p = 0,042
FGFR2 kontroly	10	6,48	6,06	3,92	0,61–10,86	
FGFR2 B2M zvýšený	36	1,42	6,39	9,45	0,60–2,32	p = 0,031
FGFR2 B2M normální	9	3,57	8,42	5,98	1,4–12,6	
FGFR2 LDH zvýšená	46	1,25	5,32	14,98	0,5–2,32	p = 0,0032
FGFR2 LDH normální	25	2,97	6,72	8,49	1,9–6,96	

Sérové koncentrace TNF-α a TGF-β1 jsou v pg/ml. Expres TGFβRII a FGFR2 jsou v %.

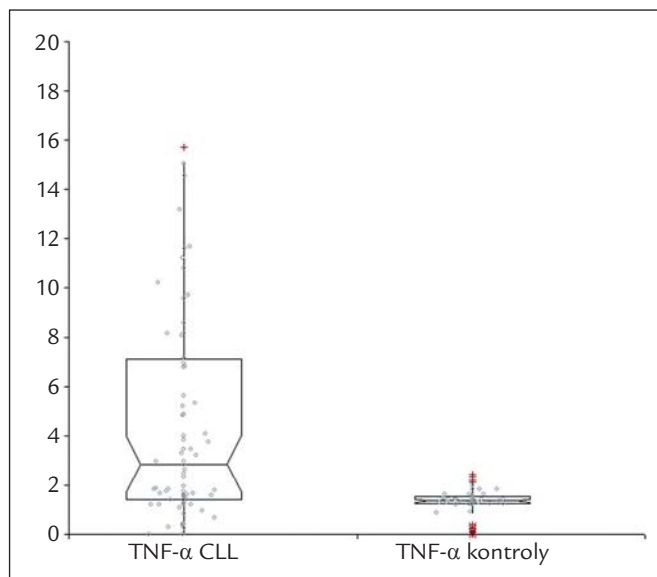
CLL – chronická lymfocytární leukemie, TNF-α – tumor nekrotizující faktor α, TGF-β1 – transformující růstový faktor β-1, FGFR2 – typ 2 receptoru pro fibroblastový růstový faktor-2, B2M – β₂-mikroglobulin, LDH – laktátdehydrogenáza, IgVH – mutační stav genů kódujících variabilní části těžkých řetězců imunoglobulinů, ZAP-70 – zeta-asociovaný protein o 70 kilodaltonech, s – standardní odchylka, IS – interval spolehlivosti

Hodnocení klasických prognostických faktorů (Rai stadia, ALC, LDH, B2M) a přítomnosti masivní lymfadenopatie bylo provedeno v době odběru zkoumaných ukazatelů. Moderní ukazatele byly vyšetřeny při zařazení do studie

pouze v případě, že nebyly k dispozici v době stanovení diagnózy CLL.

Vyšetření sérových koncentrací TNF-α a TGF-β1 bylo pro srovnání provedeno u skupiny 57 dobrovolných zdravých dárců krve (26 mužů a 31 žen,

medián 35 let, rozmezí 19–51 let) a stanovení lymfocytární exprese TGFβRII a FGFR2 u 10 dobrovolných zdravých dárců krve (6 mužů a 4 ženy, věkový medián 34 let, rozmezí 25–65 let) stejnými metodikami jako u pacientů s CLL.



Graf 1. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s CLL v porovnání s kontrolami. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

Pro stanovení sérových koncentrací TNF- α a TGF- β 1 byly všechny vzorky séra po centrifugaci zamrazeny při teplotě -70°C až do měření. Stanovení koncentrací bylo provedeno standardními postupy metodiky ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a dle firemních doporučení. Použity byly soupravy Quantikine HS Human TNF- α a Quantikine Human TGF- β 1 (R&D Systems, USA).

K hodnocení lymfocytární exprese TGF β R2 a FGFR2 byly použity vzorky nesrážlivé periferní krve, které byly měřeny naprůtokovým cytometrem EPICSXL (Beckman Coulter, USA) se softwarem EPICS XL verze 3.0. K hodnocení exprese TGF β R2 byla použita myší monoklonální protilátka proti lidskému TGF β R2 konjugovaná s karboxyfluoresceinem (R&D Systems, USA). K hodnocení exprese FGFR2 byla použita lyofilizovaná neznačená protilátka FGFR2 (IIIc) (R&D Systems, USA) a sekundární protilátka značená FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (Beckman Coulter, USA).

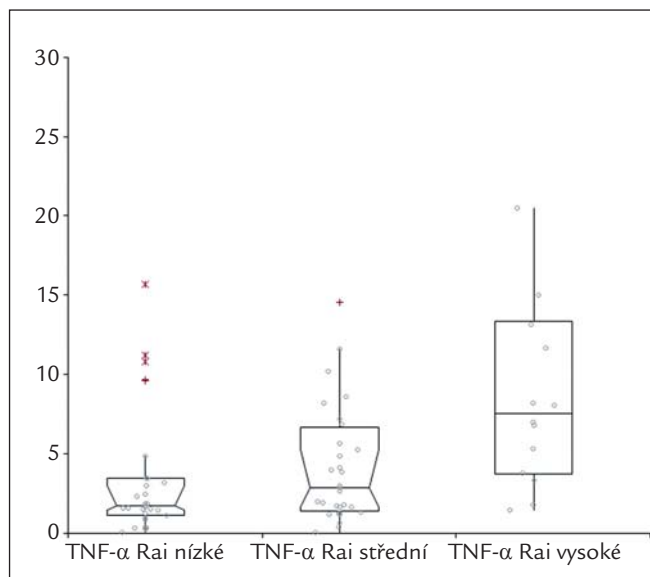
Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Analyse-it (Analyse-it Software Ltd, Velká Británie). Všechna

data byla testována na normalitu Shapirovým-Wilkovým testem. Pokud bylo rozdělení dat normální, byl k testování rozdílů vůči kontrolní skupině použit parametrický t-test. Pokud neměla data normální rozdělení, byl užit neparametrický Mannův-Whitneyův U test. Korelace byla stanovena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (r). Celkové přežití (overall survival – OS) bylo definováno jako období od data odběru vybraných ukazatelů do úmrtí na jakoukoliv, i nenádorovou příčinu. Období do zahájení léčby (time to treatment – TTT) bylo hodnoceno od data provedení odběru do data zahájení léčby 1. linie. K hodnocení OS a TTT byly zkonstruovány Kaplan-Meierovy křivky přežití a jednotlivé podskupiny porovnány pomocí log rank testu. P-hodnoty nižší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

Výsledky

V době analýzy v prosinci roku 2012 byl medián sledování žijících nemocných 48 měsíců (rozmezí 1–111 měsíců) a stav souboru byl následující: 10 nemocných (13 %) zemřelo, z toho 5 z důvodu progresu CLL. Třicet šest nemocných (48 %) progredovalo a vy-

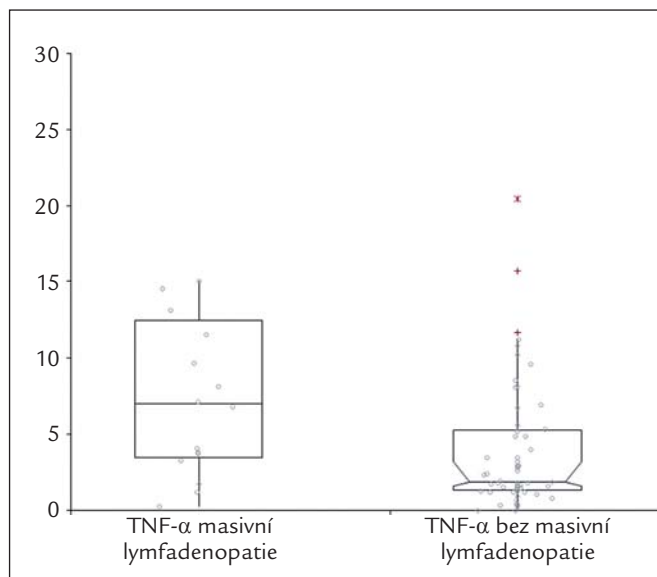


Graf 2. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání se středním i nízkým rizikem. Sérové koncentrace TNF- α se neliší mezi skupinou s nízkým a středním rizikem dle Raie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

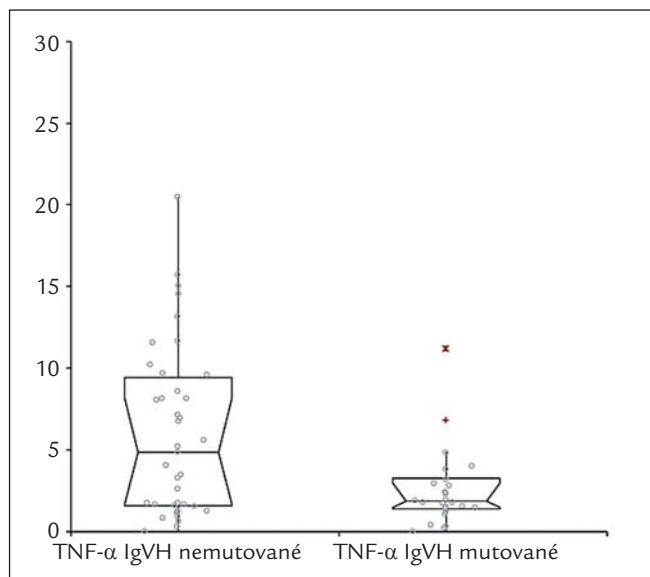
žadovalo zahájení léčby. Medián TTT celého souboru byl 44 měsíců. Pravděpodobnost 5letého přežití celého souboru byla 84 %, medián OS nebyl dosažen.

Přehled nejdůležitějších nálezů pro jednotlivé ukazatele shrnuje tab. 2.

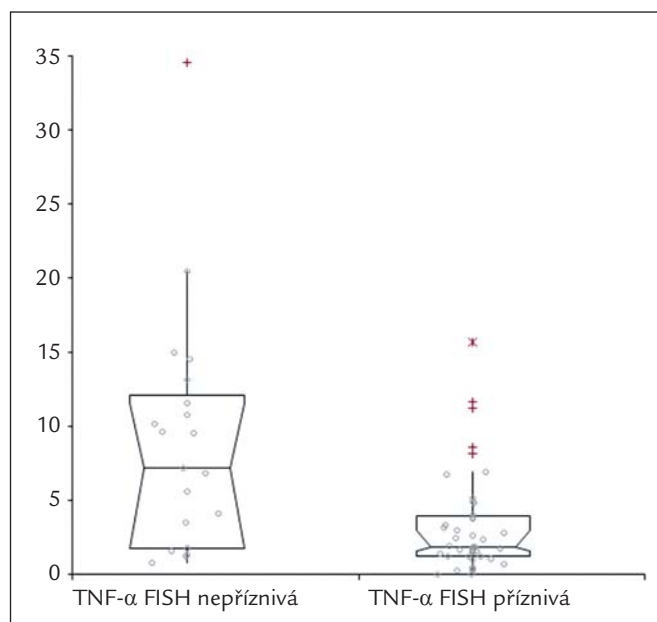
Sérový TNF- α byl detekovatelný ve všech vzorcích. Koncentrace TNF- α byly statisticky významně vyšší u pacientů s CLL (medián 2,83 pg/ml, průměrná sérová koncentrace 5,79 pg/ml) oproti kontrolní skupině (medián 1,37 pg/ml, průměrná sérová koncentrace 1,32 pg/ml) ($p < 0,0001$) (graf 1). Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v koncentracích TNF- α a mezi muži a ženami ($p = 0,78$). Významně vyšší sérové koncentrace TNF- α měli nemocní ve skupině s vysokým rizikem dle Raie v porovnání se skupinou s nízkým rizikem dle Raie (medián 7,52 vs 1,69 pg/ml, $p = 0,0008$) i v porovnání se skupinou se středním rizikem dle Raie (medián 7,52 vs 2,83 pg/ml, $p = 0,0097$). Při srovnání skupiny s nízkým a středním rizikem dle Raie nebyl v koncentracích TNF- α rozdíl ($p = 0,13$) (graf 2). Významný rozdíl nebyl ani mezi skupinami nemocných s rozdílnou koncentrací



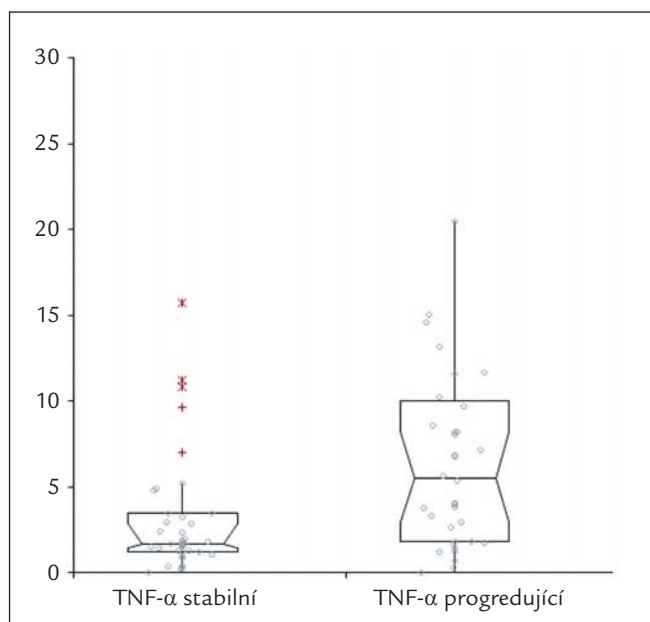
Graf 3. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s masivní lymfadenopatií. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 4. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s nemutovanými IgVH geny. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 5. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TNF- α u nemocných s nepříznivými cytogenetickými aberacemi. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 6. Nemocní s progresí CLL mají statisticky významně vyšší sérové koncentrace TNF- α než nemocní se stabilním onemocněním. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

LDH ($p = 0,14$). U nemocných se zvýšenou hladinou B2M byla sérová koncentrace TNF- α významně vyšší (medián 3,70 vs 1,54 pg/ml, $p = 0,045$). S koncentrací TNF- α slabě pozitivně koreloval absolutní počet lymfocytů ($p = 0,018$, $r = 0,27$). Nemocní s masivní lymfadenopatií měli významně vyšší koncentrace TNF- α než nemocní bez masivní lymfadenopatie (medián 7,0 vs 1,88 pg/ml, $p = 0,0083$)

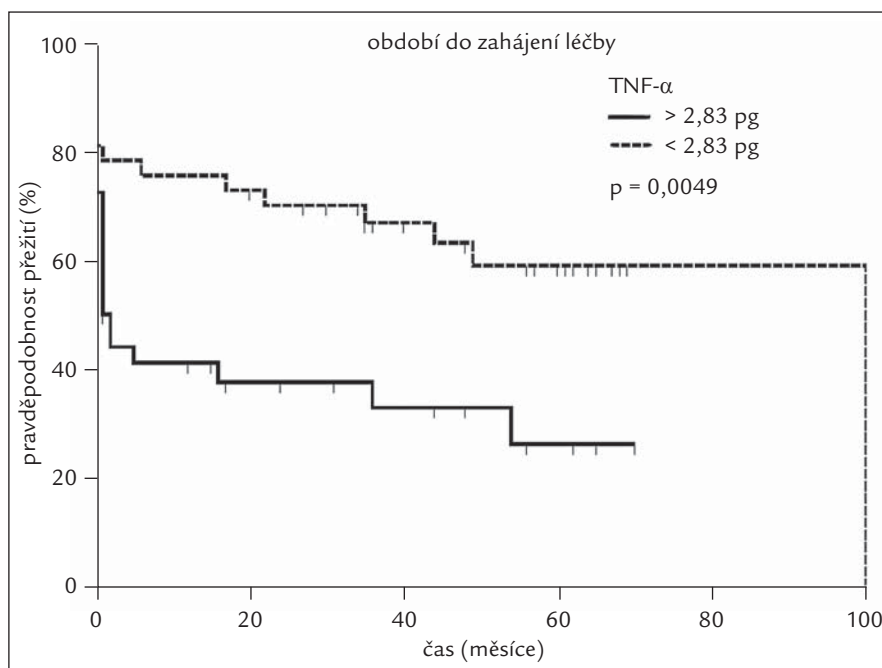
(graf 3). Statisticky významně vyšší sérové koncentrace TNF- α měli pacienti s nemutovanými IgVH geny v porovnání s mutovanými (medián 4,88 vs 1,86 pg/ml, $p = 0,041$) (graf 4), a nemocní s nepříznivými cytogenetickými aberacemi v porovnání s prognosticky příznivými (medián 7,17 vs 1,83 pg/ml, $p = 0,0014$) (graf 5). Expres ZAP-70 ani expres CD38 s koncentrací TNF- α vý-

znamně nekorelovaly ($p = 0,35$, resp. $p = 0,44$).

Nemocní, kteří v průběhu onemocnění progredovali ($n = 36$), měli významně vyšší hodnoty TNF- α než nemocní se stabilním onemocněním (medián 5,48 vs 1,68 pg/ml, $p = 0,0009$) (graf 6). Pacienti s koncentracemi TNF- α vyššími než medián ($n = 37$) měli významně kratší období do zahájení léčby než nemocní s niž-

šími koncentracemi ($n = 38$) (medián 2 vs 100 měsíců, $p = 0,0049$) (graf 7). Mezi těmito dvěma skupinami nebyl významný rozdíl v celkovém přežití ($p = 0,085$).

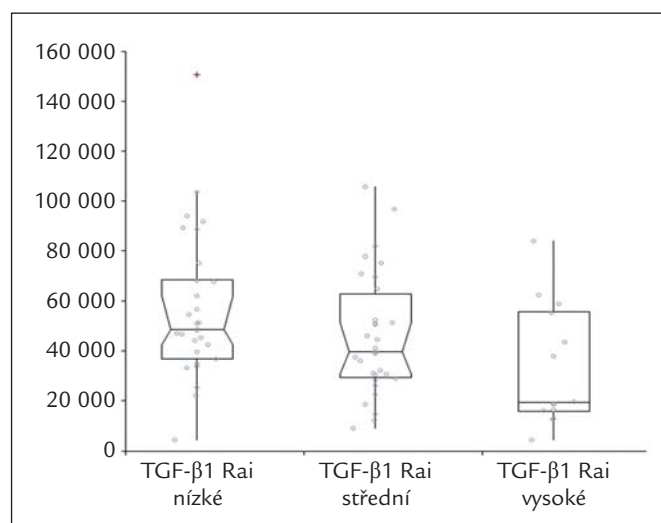
Sérový **TGF- β 1** byl detekovatelný ve všech vzorcích. Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi TGF- β 1 u pacientů s CLL (medián 44 280 pg/ml, průměrná sérová koncentrace 47 734 pg/ml) a kontrolní skupinou (medián 48 700 pg/ml, průměrná sérová koncentrace 48 068 pg/ml) ($p = 0,26$). Mezi muži a ženami nebyly koncentrace TGF- β 1 významně rozdílné ($p = 0,088$). Nemocní ve skupině s nízkým rizikem dle Raie měli významně vyšší hladiny TGF- β 1 v porovnání se skupinou s vysokým rizikem dle Raie (medián 48 735 vs 19 450 pg/ml, $p = 0,011$), nebyl ale rozdíl mezi skupinou nemocných s nízkým a středním rizikem ($p = 0,11$) a skupinou se středním a vysokým rizikem dle Raie ($p = 0,10$) (graf 8). Koncentrace TGF- β 1 slabě negativně korelovala s absolutním počtem lymfocytů v periferní krvi ($p = 0,0037$, $r = -0,33$). Významně vyšší sérové koncentrace TGF- β 1 byly nalezeny u pacientů bez masivní lymfadenopatie v porovnání s nemocnými s masivní lymfadenopatií (medián 46 170 vs



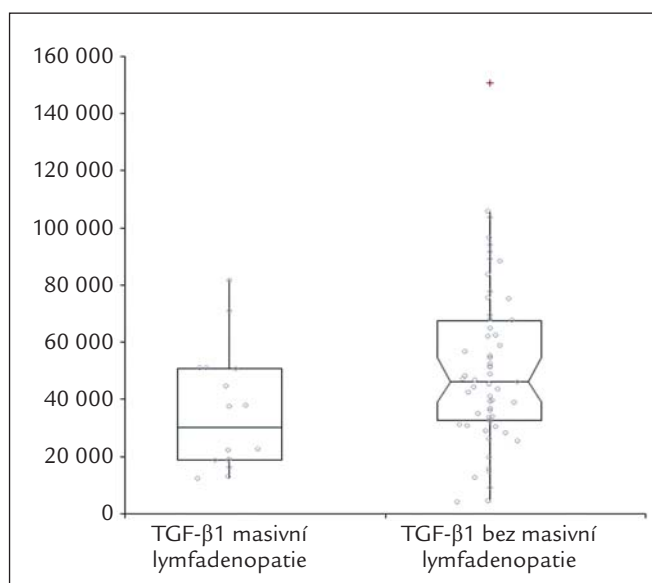
Graf 7. Období do zahájení léčby je významně kratší u nemocných se sérovými koncentracemi TNF- α vyššími než medián (2,83 pg/ml).

30 116 pg/ml, $p = 0,0410$) (graf 9). Nebyl zaznamenán rozdíl v koncentracích TGF- β 1 u nemocných se zvýšeným LDH ($p = 0,35$) a B2M ($p = 0,36$), ani u nemocných s nepříznivými cytogenetickými aberacemi ($p = 0,081$) či expresí CD38 ($p = 0,091$). Statisticky významně vyšší sérové koncentrace TGF- β 1 měli pacienti s mutovanými IgVH geny v porovnání s nemutovanými (medián

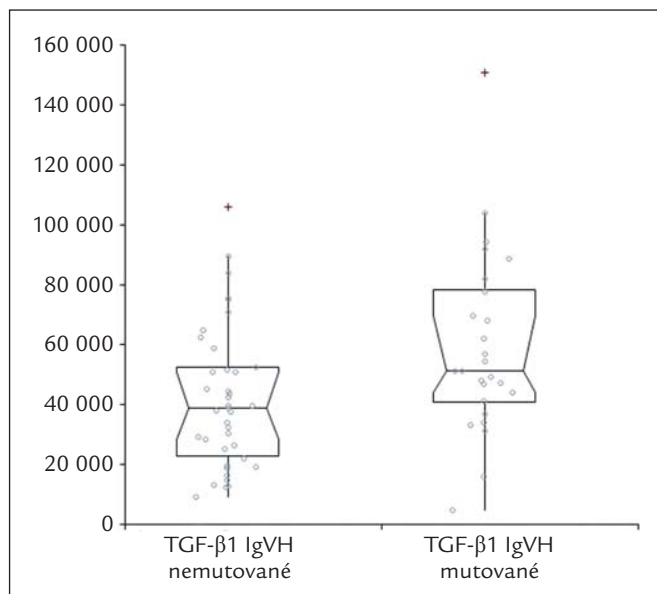
51 350 vs 39 100 pg/ml, $p = 0,012$) (graf 10), a pacienti ZAP-70 negativní (vs ZAP-70 pozitivní) (medián 47 115 vs 33 960 pg/ml, $p = 0,044$) (graf 11). S hladinou TGF- β 1 velmi významně souvisel klinický průběh onemocnění – nemocní s progredující chorobou měli významně nižší hodnoty TGF- β 1 než nemocní se stabilním onemocněním (medián 31 860 vs 49 140 pg/ml, $p = 0,0014$)



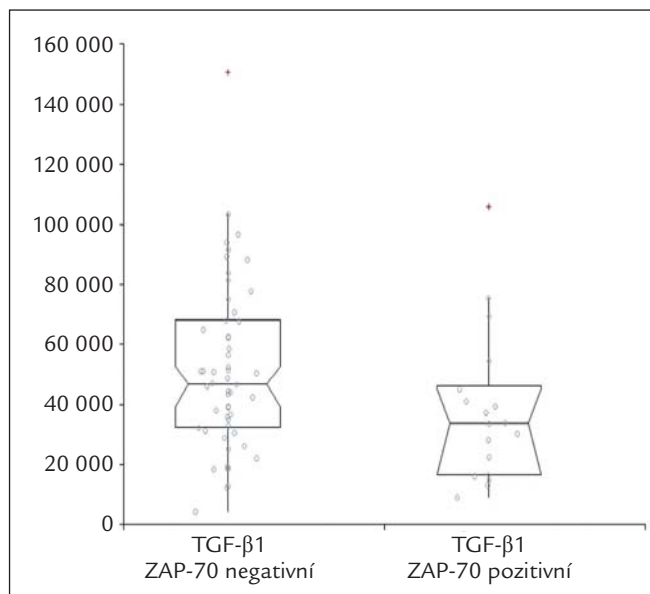
Graf 8. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných s nízkým rizikem dle Raie v porovnání s vysokým rizikem. Sérové koncentrace TGF- β 1 se neliší mezi skupinami s nízkým a středním rizikem ani mezi skupinami se středním a vysokým rizikem dle Raie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 9. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných bez masivní lymfadenopatie. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 10. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF-β1 u nemocných s mutovanými IgVH geny. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 11. Statisticky významné zvýšení sérových koncentrací TGF-β1 u nemocných se ZAP-70 negativitou. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.

(graf 12). Období do zahájení léčby bylo významně delší u pacientů, kteří měli koncentrace TGF-β1 vyšší než medián ($n = 37$) v porovnání s nemocnými s koncentracemi TGF-β1 nižšími ($n = 38$) (medián nedosažen vs medián 2 měsíce, $p = 0,016$) (graf 13). V celkovém přežití nebyl mezi těmito dvěma skupinami rozdíl ($p = 0,44$). Nebyla nalezena korelace exprese TGF-β1 a TNF-α ($p = 0,059$, $r = -0,22$).

Expresí **TGFβRII** byla měřitelná u všech nemocných, nemocní s CLL neměli v porovnání s kontrolami významně rozdílnou expresi TGFβRII (medián 1,320 vs 1,09, $p = 0,22$). Statisticky významně nižší expresi TGFβRII byla zaznamenána u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým rizikem (medián 0,83 vs 2,69, $p = 0,022$). Nebyl ale rozdíl v expresi TGFβRII mezi skupinou nemocných s nízkým a středním ($p = 0,53$) a středním a vysokým rizikem dle Raie ($p = 0,076$) (graf 14). Expresí TGFβRII nebyla rozdílná v závislosti na pohlaví ($p = 0,17$) a na laboratorních ukazatelích, jako jsou LDH a B2M ($p = 0,11$, resp. 0,78), ani mutačním stavu, cytogenetických aberacích ($p = 0,97$, resp. $p = 0,29$) a expresi ZAP-70 a CD38 ($p = 0,39$, resp.

$p = 0,94$) či přítomnosti masivní lymfadenopatie ($p = 0,31$). Nebyl rozdíl v expresi TGFβRII mezi nemocnými se stabilní a progredující chorobou ($p = 0,29$). Období do zahájení léčby ani celkové přežití nebylo významně rozdílné u pacientů, kteří měli expresi TGFβRII vyšší než medián ($n = 37$) v porovnání s nemocnými s expresí TGFβRII nižší než medián ($n = 38$) ($p = 0,46$, resp. $p = 0,81$). Nebyla nalezena souvislost mezi expresí TGFβRII a koncentrací TGF-β1 ($p = 0,69$, $r = -0,05$) ani absolutním počtem lymfocytů ($p = 0,79$, $r = -0,03$).

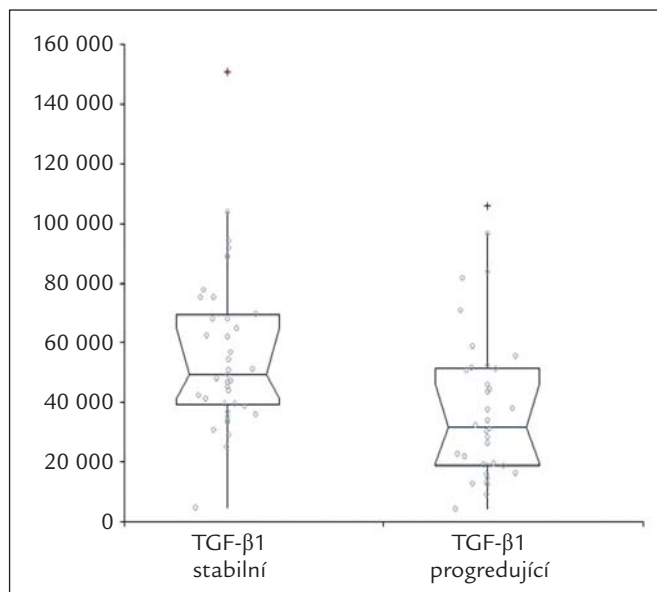
Expresí **FGFR2** na lymfocytech byla zjištěna ve všech vyšetřovaných vzorcích. Byla zjištěna statisticky významně vyšší expresi FGFR2 v kontrolní skupině v porovnání s CLL pacienty (medián 6,48 vs 1,46, $p = 0,042$). Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v expresi FGFR2 mezi muži a ženami ($p = 0,35$) a mezi rizikovými skupinami dle Raie (nízké vs střední riziko, $p = 0,77$; nízké vs vysoké, $p = 0,12$; střední vs vysoké riziko, $p = 0,11$). Nemocní s normálním LDH i B2M v séru měli statisticky významně vyšší expresi FGFR2 (medián 2,97, $p = 0,0032$, resp. medián 3,57, $p = 0,031$). Nebyla nalezena souvislost mezi expresí FGFR2 a mutačním sta-

vem a výskytem cytogenetických aberací ($p = 0,88$, resp. $p = 0,18$), ani expresí ZAP-70 a CD38 ($p = 0,12$, resp. $p = 0,89$), ani masivní lymfadenopatií ($p = 0,42$). S expresí FGFR2 slabě negativně koreloval absolutní počet lymfocytů ($p = 0,033$, $r = -0,25$). Nebyl rozdíl v expresi FGFR2 mezi nemocnými se stabilní a progredující chorobou ($p = 0,15$). Období do zahájení léčby ani celkové přežití nebylo významně rozdílné u pacientů, kteří měli expresi FGFR2 vyšší než medián ($n = 36$), v porovnání s nemocnými s expresí FGFR2 nižší než medián ($n = 39$) ($p = 0,27$, resp. $p = 0,11$). Expresí FGFR2 nekorelovala s TNF-α ($p = 0,12$), TGF-β1 ($p = 0,80$) ani TGFβRII ($p = 0,15$).

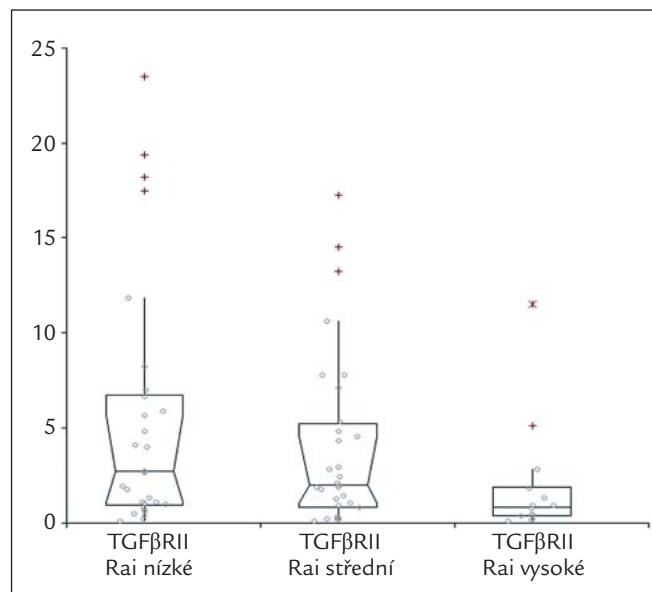
Při provedení multivariátní analýzy pro celkové přežití byly identifikovány jako statisticky významné a nezávislé 2 prognostické faktory, a to sérová koncentrace TNF-α a masivní lymfadenopatie ($p = 0,036$, resp. $p = 0,047$).

Diskuze a závěry

Stanovení a zpřesnění prognózy u pacientů s CLL je v několika posledních letech věnována velká pozornost. Zpřesnění prognózy má význam zejména u skupiny pacientů v časných klinických stadiích, kteří v současné době

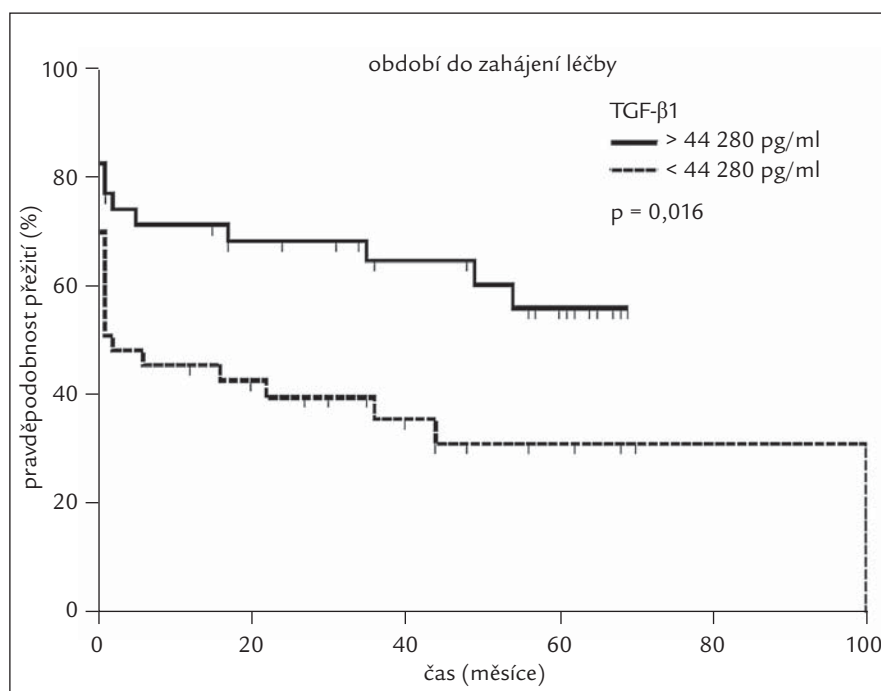


Graf 12. Nemocní s progresí CLL mají statisticky významně nižší sérové koncentrace TGF-β1 než nemocní se stabilním onemocněním. Koncentrace jsou uvedeny v pg/ml.



Graf 14. Statisticky významně nižší exprese TGFβRII u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým rizikem. Expresie TGFβRII se neliší mezi skupinami s nízkým a středním rizikem ani mezi skupinami se středním a vysokým rizikem dle Raie. Expresie je uvedena v procentech (%).

tvoří většinu nově diagnostikovaných pacientů s CLL, neboť i tito nemocní mohou velmi rychle progredovat a mít agresivní průběh onemocnění. Velkým pokrokem byl objev nových ukazatelů (zejména IgVH mutační stav, cytogenetické aberace, ZAP-70, CD38 a další), díky kterým je již v době stanovení diagnózy možné rozdělit nemocné do skupin významně se lišících prognózou, a předpovědět tak klinický průběh onemocnění. Hledání dalších nových faktorů stále pokračuje, neboť otázkou do budoucna zůstává, jak co nejlépe načasovat a přizpůsobit intenzitu léčby individuálnímu riziku nemocného právě na základě znalosti těchto nových prognostických faktorů (tzv. risk-adapted strategies) [47–49]. Z tohoto hlediska má zatím dominantní postavení nepříznivá cytogenetická aberace delece 17p13, jejíž přítomnost může v některých případech ovlivnit výběr cíleného léčebného postupu [50–53]. Nález ostatních nepříznivých ukazatelů tvoří důležité doplňující informace o prognóze nemocných. Je nutno zdůraznit, že žádný z 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 [44]. To, zda a kdy



Graf 13. Období do zahájení léčby je významně delší u nemocných se sérovými koncentracemi TGF-β1 vyššími než medián (44 280 pg/ml).

by měla být léčba zahájena na základě určení negativních prognostických faktorů zejména u pacientů v časných klinických stádiích a zda by nemocní z včasného zahájení léčby profitovali, je otázkou, kterou se zabývají klinické prospektivní studie a na kterou v sou-

časné době dosud nemáme jednoznačnou odpověď [54,55]. Prognostické faktory také vypovídají mnohé o patogenezi onemocnění. Chronická lymfocytární leukemie je příkladem onemocnění, kde zásadní roli v patogenezi hraje porucha mechanismů geneticky řízené buněčné smrti – apo-

ptózy [56,57]. Na klinickém průběhu a progresi onemocnění se kromě poruchy apoptotických mechanismů podílí také aktivace signálních drah vedoucích k proliferaci maligních buněk, např. signální dráha NF- κ B [2,3]. Značná pozornost je v posledních letech věnována také studiu angiogeneze u CLL. V séru či plazmě pacientů s CLL byly prokázány zvýšené koncentrace angiogenních faktorů, zejména VEGF a FGF-2. Lymfocyty CLL vedle tvorby angiogenních cytokinů zároveň exprimují odpovídající receptory, čímž je zajištěna autokrinní stimulace angiogenních procesů [39,40,42,43]. Vyšší hladiny těchto proangiogenních cytokinů jsou spojeny s pokročilým klinickým stadiem, časnou progresí CLL a horší odpovědí na léčbu fludarabinem [11,23,37,38,40]. Z dalších cirkulujících cytokinů, které sehrávají důležitou roli v patogenezi a biologickém chování maligního klonu a jsou často zmiňovány v souvislosti s poruchou apoptických drah, proliferací a angiogenezí u CLL, je třeba jmenovat zejména TNF- α , TGF- β 1 a jejich receptory [7,17,22,23].

TNF- α je cytokin působící anti-apoptoticky a jako autokrinní růstový faktor pro maligní B-lymfocyty [7,10–12]. V souladu s literárními údaji potvrzují naše výsledky úlohu TNF- α jako významného negativního prognostického ukazatele u CLL: významně vyšší sérové koncentrace TNF- α měli nemocní ve skupině s vysokým rizikem dle Raie v porovnání se skupinou s nízkým i středním rizikem, s masivní lymfadenopatií, s nemutovanými IgVH geny a nepříznivými cytogenetickými aberacemi. Právě IgVH a cytogenetické nálezy jsou v současné době u CLL považovány za nejdůležitější prognostické faktory ve vztahu k celkovému přežití [49]. Významně vyšší koncentrace TNF- α byly také zjištěny u nemocných s vyšší hodnotou sérového B2M, který je u CLL spojován s pokročilým klinickým stavem, objemnou lymfadenopatií, významnou infiltrací kostní dřeně, pozitivitou ZAP-70 a CD38 [47,58].

Na rozdíl od literárních údajů jsme neprokázali souvislost mezi koncentrací TNF- α a expresí CD38 a ZAP-70, pravděpodobně v důsledku relativně omezeného rozsahu souboru. S koncentrací TNF- α pozitivně koreloval absolutní počet lymfocytů, šlo však o slabou korelaci ($r = 0,27$), z čehož vyplývá, že hodnota TNF- α není lineárním ukazatelem velikosti nádorové masy. Výše koncentrace TNF- α významně souvisela s klinickým průběhem onemocnění – nemocní s progresí CLL měli významně vyšší hodnoty TNF- α než nemocní se stabilním onemocněním. Také TTT bylo významně kratší u pacientů s vyššími koncentracemi TNF- α , naznačen byl i trend směrem ke kratšímu OS.

V rozporu s literárními daty jsme nepotvrdili zvýšení sérových koncentrací TGF- β 1 u nemocných s CLL v porovnání s kontrolami. Při analýze jednotlivých podskupin a zcela v souladu s dosud publikovanými pracemi měli i v našem souboru nemocní ve skupině s nízkým rizikem dle Raie významně vyšší hladiny TGF- β 1 v porovnání se skupinou s vysokým rizikem dle Raie. Významně vyšší koncentrace TGF- β 1 byly také spojeny s výskytem dalších příznivých prognostických ukazatelů, jako jsou nepřítomnost masivní lymfadenopatie, mutované IgVH geny a negativita ZAP-70 i příznivějším klinickým průběhem onemocnění (vyšší hladiny měli pacienti se stabilním onemocněním a delším TTT). Dále koncentrace TGF- β 1 negativně korelovala s absolutním počtem lymfocytů. To, že je role TGF- β 1 v patogenezi CLL rozporuplná a ne zcela jasná, prokázala řada prací [17,22–25,59,60]. TGF- β 1 působí jako důležitý autokrinní inhibitor proliferace maligních B-lymfocytů a má i pro-apoptotickou funkci. Má však také vlastnosti imunosupresivní a pro-angiogenní, což je spojováno s méně příznivou prognózou [1,20,23,32,51]. Signální dráha TGF- β je regulována na několika úrovních počínaje vazbou ligandů na TGF β R přes regulaci v nitrobuněčné signalizaci až po regulaci transkripce

příslušných genů na úrovni buněčného jádra. I tento fakt znesnadňuje hodnocení vlivu TGF- β v patogenezi CLL [17,20].

V našem souboru byla statisticky významně nižší lymfocytární exprese TGF β RII zaznamenána u nemocných s vysokým rizikem dle Raie v porovnání s nemocnými s nízkým rizikem. Nízká exprese TGF β RII by u nemocných v pokročilých klinických stadiích dle Raie mohla přispívat k rezistenci na anti-proliferativní působení TGF- β a horší prognóze.

Naše práce přispěla k rozšíření dosavadních znalostí o expresi FGFR u CLL; v této oblasti bylo dosud k dispozici naprosté minimum dat. Expresi FGFR2 byla významně nižší na CLL lymfocytech v porovnání s kontrolní skupinou, což mohlo být způsobeno negativní zpětnou vazbou při zvýšených sérových koncentracích FGF-2. Prognostický význam FGFR2 nebyl prokázán. Nebyla zjištěna vzájemná souvislost mezi jednotlivými hodnocenými ukazateli. Statisticky významnými a nezávislými prognostickými faktory pro celkové přežití byly v našem souboru zvýšené sérové koncentrace TNF- α a přítomnost masivní lymfadenopatie. Některé práce prokázaly, že nemocní s masivní lymfadenopatií mají horší prognózu (nižší procento kompletních remisí, kratší období do progresu, naznačen i trend směrem ke kratšímu OS, vysoké riziko relapsu po alogenní transplantaci) [61–64]. I naše práce potvrzuje, že nález masivní lymfadenopatie, která byla přítomna u 16 % nemocných a v naprosté většině případů (85 %) se jednalo o retroperitoneální uzliny, má negativní prognostický význam s dopadem na OS. Dalším důležitým zjištěním je fakt, že diagnóza retroperitoneální lymfadenopatie byla ve všech případech založena na UZ vyšetření. Naše nálezy tedy také podporují význam použití zobrazovacích metod (resp. UZ) u CLL, což je v současné době velmi diskutovaná problematika. Dle současných doporučení nejsou zobrazovací metody zahrnuty v rámci běžné péče ani k vstupnímu určení roz-

sahu onemocnění ani k hodnocení léčebné odpovědi [44].

Dosud nebyla publikována práce, ve které by bylo provedeno tak rozsáhlé srovnání TNF- α , TGF- β 1, TGF β RII a FGFR2 s prognostickými faktory a klinickým průběhem onemocnění. V tomto jsou naše výsledky prioritní. V naší studii měly největší význam zvýšené sérové koncentrace TNF- α , které byly spojeny s nepříznivou prognózou, a zvýšené sérové koncentrace TGF- β 1, které naopak souvisely s příznivějším klinickým průběhem. Další výzkum těchto cytokinů a jejich signálních drah je cenný nejen z prognostického, ale také léčebného hlediska. Monoklonální protilátky proti TNF- α jsou již nyní používány např. k léčbě Crohnovy choroby, revmatoidní artritidy či psoriázy [65]. Objevují se poznatky o použití tzv. antisense RNA či oligonukleotidů ke snížení hladiny TGF- β či použití protilátky proti TGF- β zejména u pokročilých solidních nádorů [17,20]. K dispozici jsou rovněž nadějná data z klinických studií využívajících antiangiogenní léky, jako jsou thalidomid či lenalidomid [36,66].

Práce byla podpořena výzkumným záměrem PRVOUK P37/08/400 Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, grantem NT/13412-4 IGA MZ ČR a 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. Zanioni A, Imperiali FG, Pasquini C et al. Cytokine modulation of nuclear factor-kB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 2003; 31: 185-190.
3. Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med (Berl)* 1999; 77: 282-293.
4. Gerondakis S, Strasser A. The role of Rel/NF-kappaB transcription factors in B lymphocyte survival. *Semin Immunol* 2003; 15: 159-166.
5. Digel W, Porzolt F, Schmid M et al. High levels of circulating soluble receptors for tumor necrosis factor in hairy cell leukemia and type B chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 1992; 89: 1690-1693.
6. Rosati E, Sabatini R, Tabilio A et al. B-chronic lymphocytic leukemia cells exert an in vitro cytotoxicity mediated by tumor necrosis factor alpha. *Leuk Res* 2005; 29: 829-839.
7. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T et al. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1215-1219.
8. Kast RE, Altschuler EL. Anti-apoptosis function of TNF-alpha in chronic lymphocytic leukemia: lessons from Crohn's disease and the therapeutic potential of bupropion to lower TNF-alpha. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53: 143-147.
9. Trentin L, Zambello R, Agostini C et al. Expression and regulation of tumor necrosis factor, interleukin-2, and hematopoietic growth factor receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1994; 84: 4249-4256.
10. Cheson BD. *Chronic lymphoid leukemias: Second Edition, revised and Expanded*. New York: Marcel Dekker, Inc. 2001: 118-141.
11. Waage A, Espevik T. TNF receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1994; 13: 41-46.
12. Munzert G, Kirchner D, Stobbe H et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* 2002; 100: 3749-3756.
13. Bojarska-Junak A, Hus I, Szczepanek E et al. Peripheral blood and bone marrow TNF and TNF receptors in early and advanced stages of B-CLL in correlation with ZAP-70 protein and CD38 antigen. *Leuk Res* 2008; 32: 225-233.
14. Singer M, Assem M, Abdel AB et al. Role of TNF-alpha as a survival prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia patients. *Egypt J Immunol* 2011; 18: 51-60.
15. Lech-Maranda E, Grzybowska-Lzydorczyk O, Wyka K et al. Serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 levels as markers to predict outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia in different risk groups defined by the IGHV mutation status. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012; 60: 477-486.
16. Huang SS, Huang JS. TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem* 2005; 96: 447-462.
17. Dong M, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. *Blood* 2006; 107: 4589-4596.
18. Buske C, Becker D, Feuring-Buske M et al. TGF-beta and its receptor complex in leukemic B-cell precursors. *Exp Hematol* 1998; 26: 1155-1161.
19. von Bergwelt-Baildon M, Maecker B, Schultze J et al. CD40 activation: potential for specific immunotherapy in B-CLL. *Ann Oncol* 2004; 15: 853-857.
20. Fuchs O. Úloha signální dráhy indukované transformačním růstovým faktorem beta při vzniku nádoru. *Klin Onkol* 2002; 15: 7-16.
21. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 6271-6274.
22. Friedenberg WR, Salzman SA, Phan SM et al. Transforming growth factor-beta and multidrug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol* 1999; 16: 110-118.
23. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm* 2003; 12: 167-171.
24. Ho CL, Phylly RL, Li CY. B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation of clinical stages with angiogenic cytokine expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 154-160.
25. DeCoteau JF, Knaus PI, Yankelev H et al. Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5877-5881.
26. Lagneaux L, Delforge A, Bron D et al. Heterogenous response of B lymphocytes to transforming growth factor-beta in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with the expression of TGF-beta receptors. *Br J Haematol* 1997; 97: 612-620.
27. Schiemann WP, Rotzer D, Pfeifer WM et al. Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-resistant B cells from chronic lymphocytic leukemia patients contain recurrent mutations in the signal sequence of the type I TGF-beta receptor. *Cancer Detect Prev* 2004; 28: 57-64.
28. Romano S, Mallardo M, Chiurazzi F et al. The effect of FK506 on transforming growth factor beta signaling and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica* 2008; 93: 1039-1048.
29. Lagneaux L, Delforge A, Bernier M et al. TGF-beta activity and expression of its receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 31: 99-106.
30. Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 263-267.
31. Baguma-Nibasheka M, Li AW, Osman MS et al. Coexpression and regulation of the FGF-2 and FGF antisense genes in leukemic cells. *Leuk Res* 2005; 29: 423-433.
32. Bairey O, Zimra Y, Shakrai M et al. Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113: 400-406.
33. Smolej L, Benešová P. Význam angiogeneze u maligních nádorů. *Acta Medica Suppl* 2005; 48: 69-72.
34. Smolej L, Andrýs C, Maisnar V et al. Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2005; 48: 57-58.
35. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Cladribine decreases the level of angiogenic factors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 2002; 49: 145-148.
36. Smolej L, Andrýs 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 leukémií a klesají po intenzivní léčbě obsahující fludarabin. *Vnitř Lék* 2007; 53: 1171-1176.
37. Molica S, Vitelli G, Levato D et al. Clinicoprognostic implications of increased serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 2002; 86: 31-35.

38. 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.
39. 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.
40. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur Cytokine Netw* 2005; 16: 41–46.
41. Allouche M, Bayard F, Clamens S et al. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and FGF-receptors in human leukemic cells. *Leukemia* 1995; 9: 77–86.
42. Krejci P, Dvorakova D, Krahulcova E et al. FGF-2 abnormalities in B cell chronic lymphocytic and chronic myeloid leukemias. *Leukemia* 2001; 15: 228–237.
43. König A, Menzel T, Lynen S et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia* 1997; 11: 258–265.
44. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446–5456.
45. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. In: Gale RP, Rai KR (eds). *Chronic Lymphocytic Leukemia. Recent Progress and Future Direction*. New York: AR Liss 1987.
46. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910–1916.
47. Bockstaele VF, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev* 2009; 23: 25–47.
48. 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.
49. Motýčková M, Žák P, Vroblová V et al. Prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie. *Vnitř Lék* 2011; 57: 847–857.
50. Malčíková J, Pospíšilová Š, Mayer J et al. Význam nádorového supresoru p53 u chronické lymfocytární leukemie. *Transfúze Hematol Dnes* 2010; 16: 29–32.
51. Kozák T. Prognostické faktory chronické lymfocytární leukemie. *Transfúze Hematol Dnes* 2010; 16: 56–61.
52. Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 455–468.
53. Hallek M, Pflug N. State of the art treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Rev* 2011; 25: 1–9.
54. 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.
55. Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008; 22: 211–219.
56. Osorio LM, Jondal M, Aguilar-Santelises M. Regulation of B-CLL apoptosis through membrane receptors and Bcl-2 family proteins. *Leuk Lymphoma* 1998; 30: 247–256.
57. Novosad J, Kodydková K, Krejsek J. Apoptóza, její mechanismy a medicínský význam. II. Poruchy regulace apoptózy a jejich souvislost s rozvojem onemocnění. *Vnitř Lék* 2001; 47: 387–390.
58. 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.
59. Douglas RS, Capocasale RJ, Lamb RJ et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. *Blood* 1997; 89: 941–947.
60. Lagneaux L, Delforge A, Dorval C et al. Excessive production of transforming growth factor-beta by bone marrow stromal cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia inhibits growth of hematopoietic precursors and interleukin-6 production. *Blood* 1993; 82: 2379–2385.
61. 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.
62. Smolej L, Bachh A, Vodárek P et al. The role of imaging methods in chronic lymphocytic leukemia: significant internal lymphadenopathy is frequent and associated with shorter overall survival. *Haematologica* 2012; 97: 302.
63. Eichhorst BF, Fischer K, Fink AM et al. Limited clinical relevance of imaging techniques in the follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia: results of a meta-analysis. *Blood* 2011; 117: 1817–1821.
64. Sorrow ML, Storer BE, Sandmaier BM et al. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4912–4920.
65. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S et al. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010; 49: 1215–1228.
66. Pour L, Hájek R, Buchler T et al. Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů. *Vnitř Lék* 2004; 50: 930–938.

MUDr. Monika Motýčková, Ph.D.

www.fnhk.cz

e-mail: motyckova.monika@seznam.cz

Doručeno do redakce: 18. 2. 2013

Přijato po recenzi: 21. 4. 2013

www.csnn.eu