

CHRONICKÁ LYMFOCYTOVÁ LEUKÉMIA – BIOLÓGIA, KLINICKÝ OBRAZ A PROGNOZA (1. ČASŤ)

Eva Mikušková, Ludmila Demitrovičová

OKHT, Národný onkologický ústav, Bratislava

Rýchly rozvoj molekulej biológie a genetiky zmenil výrazne pohľad na biológiu chronickej lymfocytovej leukémie, ktorá bola považovaná za „chorobu z akumulácie“ imunologicky nekompetentných lymfocytov. Kinetické štúdie dokázali normálnu, dokonca aj vyššiu proliferáciu so schopnosťou odpovedať na antigén. Nové prognostické markery – cytogenetické aberácie, mutačný stav, pozitívita tyrozínkinázy ZAP 70 lepšie korelujú s klinickým priebehom tejto heterogénnej entity. Kritériá diagnózy, stagingu a zhodnotenia terapeutickje odpovede formulované Bruceom Chesonom a kolektívom v roku 1995 boli v novej podobe publikované IWCLL – sponsored working group (International workshop on chronic lymphocytic leukemia) v Blood9.

Kľúčové slová: chronická lymfocytová leukémia, mutačný stav, génový podpis, mikroprostredie, cytogenetické aberácie, imunofenotyp, vyšetrenie kostnej drene.

CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – BIOLOGY, PROGNOSIS AND CLINICAL PICTURES (PART 1)

Rapid development of molecular biology and genetics changed the view on biology of chronic lymphocytic leukemia, previously considered to be a disease from accumulation of immunoincompetent lymphocytes. Kinetic studies proved normal, even increased proliferative activity with antigen response. New prognostic markers - cytogenetic aberrations, mutational status, tyrosin-kinase ZAP 70 positivity show better correlation with clinical course of this heterogenous entity. Diagnostic criteria, staging a treatment response evaluation, formulated by Bruce Cheson et al were revised and published by IWCLL (International workshop on chronic lymphocytic leukemia) – sponsored working group in Blood.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, mutational status, arrays, microenvironment, cytogenetic aberrations, immunophenotype, bone marrow examination.

Onkológia (Bratisl.), 2008, roč. 3 (5): 316–319

Definícia

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je novové ochorenie lymfocytov. Podľa WHO klasifikácie (World Health Organization, Svetová zdravotnícka organizácia) je to vždy malignita z B-lymfocytov a patrí do rodiny lymfoproliferácií (leukemický variant lymfocytového lymfómu) (1).

Etiológia a epidemiológia

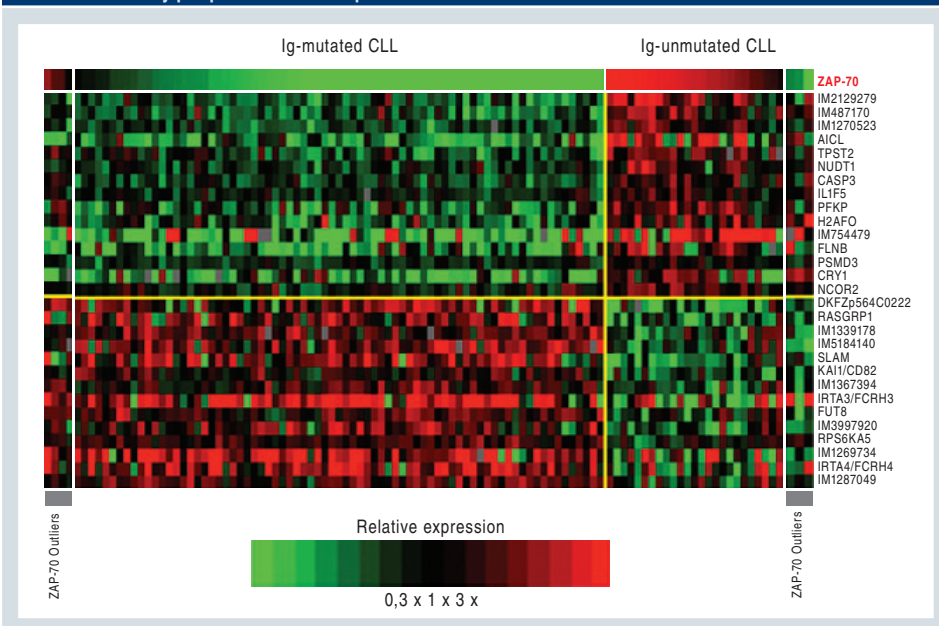
Príčina je neznáma. Je to jediná leukémia, u ktorej nezohrávajú úlohu vonkajšie faktory. Známe rizikové faktory sú vysoký vek a hematologická malignita v rodine, pozorovaný je familiárny výskyt CLL (5 – 10 %).

CLL je najčastejšia leukémia dospelých v Európe a Severnej Amerike (2) – tvorí približne 25 – 30 % leukémií s incidenciou 3 – 4/100 000. Medián veku je medzi 65 – 70 rokom, muži sú postihnutí dvakrát častejšie ako ženy a s agresívnejším priebehom.

Patofyziológia

Analýza génov pre imunoglobulíny odhalila existenciu dvoch odlišných biologických foriem – **podľa somatickej mutácie génu pre variabilnú časť molekuly ťažkého reťazca imunoglobulínu (IgVH)** – kódujú odlišné povrchové imunoglobulíny (Ig). Nemutovaný gén je taký, ktorý má génovú zhodu na 98 % s pôvodnou germinálnou líniou (arbitrárne stanovená hranica – homológia na 98 %).

Obrázok 1. Génový podpis. Rozdielna expresia ZAP-70.



Lymfocyt CLL s nemutovaným génom exprimuje viacej BCR (B-cell receptor) a zachováva si vysokú reaktivitu na antigén (3). Pravdepodobne prekonal určitý stupeň antigénnej stimulácie (a aj selekcie) v dobe malígnej transformácie – bez dozoru T-lymfocytov – v marginálnej zóne lymfatického folikulu.

Lymfocyty s mutovanými génmi prekonal „normálnu“ antigénnu stimuláciu v germinatívnom cen-

tre sekundárneho folikulu lymfatickej uzliny (toto je fyziologické miesto hypermutácií), majú vysoko špecifické Ig a nereagujú na antigén. Klinicky koreluje nález tzv. mutačného stavu úzko s prognózou: „mutovaná CLL“ (M-CLL) je klinicky priaznivejšia, u „nemutovanej CLL“ (U-CLL) (zahŕňa aj gén V 3-21) dochádza k rýchlej progresii aj s rozvojom cytogeneticky nepriaznivých markerov (pozri ďalej).

Napriek klinickým a molekulovým odlišnostiam posledné štúdie z oblasti génovej expresie dokázali, že CLL je charakterizovaná spoločným génovým podpisom, ktorý je nezávislý od mutačného stavu a odlišuje CLL od zdravých buniek a ostatných lymfoproliferácií a poukazuje na spoločný mechanizmus transformácie – čo podporuje napríklad aj monotónny fenotypový podpis. **Génový podpis** sa líši asi v 100 génoch – signifikantne hlavne v ZAP 70 (*Zeta chain associated protein of 70 kd* – pozri ďalej).

Dlho bola CLL považovaná za chorobu z akumulácie maligne transformovaných a imunologicky nekompetentných zreých B-lymfocytov spôsobenú predovšetkým defektom v programovanej bunkovej smrti (defekt apoptózy). Na základe nových kinetických štúdií ale predpokladáme, že bunky CLL sú odvodené z imunokompetentných B-lymfocytov, ktoré odpovedajú na (auto-) antigén a **proliferujú normálne** alebo v rámci subpopulácií dokonca rýchlejšie ako zdravé bunky – ide o heterogénnu chorobu, ktorá sa líši stavom aktivácie a vyzrievania medzi pacientmi a dokonca aj medzi subpopuláciami jednotlivého klonu pacienta (5). Bunky s vyššou proliferáčnou aktivitou sú lokalizované v kostnej dreni a lymfatických uzlinách, kde tvoria proliferáčnú centrá. V periférnej krvi je bunkový cyklus detekovaný veľmi zriedkavo.

Prežitie buniek CLL ovplyvňujú zásadným spôsobom aj **elementy mikroprostredia** – B-bunky, T- a NK-bunky, dendritické bunky – priamo alebo prostredníctvom cytokínov – bránia apoptóze a pravdepodobne udržiavajú chemorezistentný pool.

Klinický obraz

CLL prebieha roky bez príznakov, často je diagnostikovaná náhodne – napríklad v rámci preventívnych prehliadok, asi 1/2 pacientov je totiž iníciaľne bez symptómov.

Lymfocytóza je u 2/3 pacientov iníciaľne nižšia ako $30 \times 10^9/l$. Zaujímavé je, že ani pri extrémnej lymfocytóze okolo $600 \times 10^9/l$ nepozorujeme prejavy hyperviskózneho syndrómu (na NOÚ maximálna doteraz pozorovaná hodnota $650 \times 10^9/l$)

Typická je generalizovaná **lymfadenopatia** (2 – 3 cm) – postihuje krčnú, axilárnu a inguinálnu oblasť, v pokročilých štádiách aj abdominálne uzliny.

Splenomegália je prítomná u 50 % pacientov iníciaľne, veľkosť často koreluje s pokročilosťou choroby. Niekedy je izolovaným klinickým prejavom bez lymfadenopatie (splenomegalická forma) (6). V pokročilých štádiách môžeme detekovať extranodálnu infiltráciu – tonzily, prostata, zriedkavo iné orgány. Môžu sa objaviť celkové klinické tzv. „B“ **príznamy** (horúčka, nočné potenie, chudnutie), postupná kachektizácia.

Anémia je častou komplikáciou, ktorá vzniká z viacerých príčin:

1. je spôsobená infiltráciou drene a zodpovedá pokročilosti ochorenia (→ mechanický útlak a pôsobenie cytokínov),
2. autoimúna hemolytická anémia (AIHA): 10 – 35 % pacientov má pozitívny Coombsov test, AIHA sa manifestuje v mierne nižšom % (10 – 15 %) (CLL je najčastejšou príčinou sekundárnych hemolytických anémií),
3. na imúnnom podklade vzniká aj čistá aplázia erytrocytového radu – pure red cell aplázia – 1 – 6 % pacientov (T-lymfocyty inhibujú proliferáciu erytroidných prekurzorov v kostnej dreni),
4. raritná anémia spôsobená infekciou parvovírusom B19.

Trombocytopenia sa vyskytuje ako:

1. prejav zlyhania KD,
2. autoimúna trombocytopenia – postihuje asi 2 – 4 % pacientov.

Vzhľadom ku kombinovanému **imunodeficitu** (hypogamaglobulinémia; inhibícia B-lymfocytov, defekt bunkovej imunity: funkčné abnormality T-lymfocytov, defekt NK-buniek (natural killer – prirodzený zabíjač) a LAK-buniek (lymphokine-activated killers – lymfokínmi aktivovaní zabíjači), porušenie ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity – bunková cytotoxicita závislá na protilátkach); dysfunkcia a zníženie absolútneho počtu neutrofilov, defekt monocytov, porucha v komplementovej aktivite), sú pacienti náchylní na bakteriálne infekcie, incidencia *herpes zoster* a *herpes simplex* je okolo 30 %; v súvislosti s liečbou vzrastajú oportúnne infekcie: *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis carinii*, herpesvírusy vrátane cytomegalovírusu (7). Masívne izolované zväčšenie LU v ktorejkoľvek lokalite je podozrivé z transformácie do non-Hodgkinovho lymfómu (NHL) vyššieho stupňa malignity – transformovať môže asi v 1 % ročne – do difúzneho veľkobunkového lymfómu (DLBCL) – Richterov syndróm alebo do prolymfocytovej leukémie. Pri CLL pozorujeme vyšší výskyt solídnych nádorov (melanóm, bronchogénny karcinóm, karcinóm laryngu, žalúdka...)

Diagnóza

Diagnostické kritériá

V roku 1988 a 1996 boli pracovnou skupinou pre CLL (*National Cancer Institute-sponsored Working Group on chronic lymphocytic leukemia* – NCI-SWG) publikované štandardné postupy na diagnostiku, staging a zhodnotenie liečebnej odpovede (8). Revidované guidelines boli publikované t. r. IWCLL – *sponsored working group (International workshop on chronic lymphocytic leukemia)* v Blood (9).

Morfologické vyšetrenie periférnej krvi a potvrdený charakteristický fenotyp pomocou prietokovej cytometrie je k postaveniu diagnózy postačujúce: **CD19+**, **CD23+**, **CD5+**, CD20+ (slabá), CD22+ (slabá), CD79a+, CD43+, CD11c+(slabá), slabá expresia sIgM +/-IgD, CD10-, cyclinD1-, CD79b-, FMC7-.

Vyšetrenie kostnej drene (KD) nie je na stanovenie diagnózy bezpodmienečne nutné, ale informuje nás o rozsahu infiltrácie, príčine cytopénie a pomáha zhodnotiť dreňovú rezervu. Aspirát aj biopsiu KD sa odporúča realizovať pred liečbou, pri hodnotení jej efektu a aj pri perzistujúcich cytopéniách.

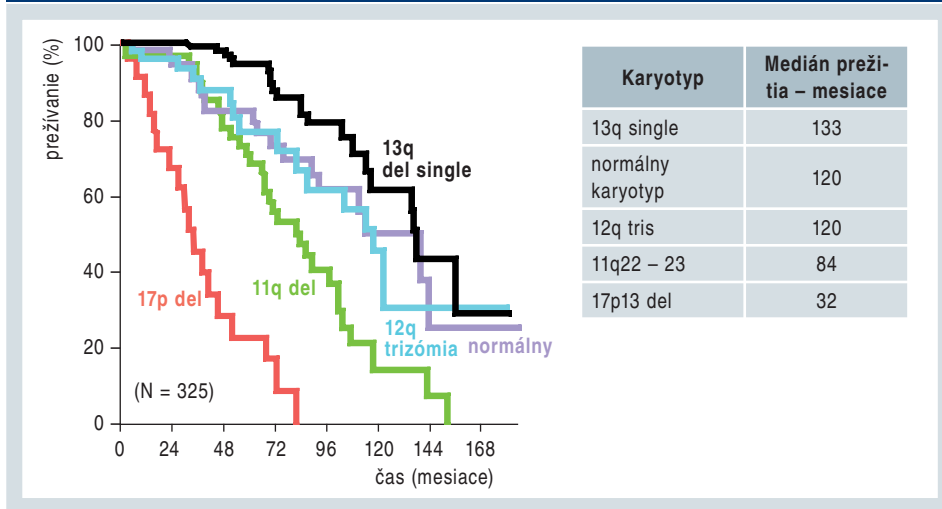
Prognostické faktory

Okrem klasických diagnostických metód dnes patrí k „žiaducemu“ štandardu (9) (zatiaľ vo všeobecnej praxi nie je obligátne) aj **genetické** vyšetrenie – ako základný prediktor prognózy nezávislý od klinického štádia a mutačného stavu. Používaním interfázovej **FISH** vieme detekovať cytogenetické lézie u > 80 – 90 % pacientov s rôznymi klinickými črtami: **deléciu 13q14** (14 – 40 %), **trizómiu 12 chromozómu** (11 – 18 %) charakterizuje atypická morfológia, pre **deléciu 11q** (10 – 32 %) je typický mladší vek, rozsiahla lymfadenopatia a rýchla progresia, **deléciu 17p** (3 – 27 %) charakterizuje agresívny priebeh s chemorezistenciou na alkylačné látky, purínové analógy a aj rituximab, **6q-** (2 – 9 %) javí plazmocytoidné črty (10).

Tabuľka 1.

Diagnostické kritériá	NCI-SWG 1996	IWCLL 2008
lymfocytóza v periférnej krvi	> $5 \times 10^9/l$	> $5 \times 10^9/l$
morfológia lymfocytov	nešpecifikované – zreleho vzhľadu	malé, zrele s úzkym lemom cytoplazmy, s denzným jadrom bez jadriek
atypické bunky (prolymfocyty)	< 55 % alebo < $15 \times 10^9/l$	< 55 %
trvanie lymfocytózy	nevyžaduje sa	> 3 mesiace
imunofenotyp	≥ 1 B znak (CD 19, CD 20, CD 23) a pozitivita CD 5 pri negativite ostatných T znakov monoklonová expresia κ a λ reťazca slabá expresia povrchového Ig	≥ 1 B znak (CD 19, CD 20, CD 23) a pozitivita CD 5 pri negativite ostatných T znakov monoklonová expresia κ a λ reťazca slabá expresia povrchového Ig
kostná dreň	≥ 30 % lymfocytóza	≥ 30 % lymfocytóza

Obrázok 2. Prežívanie – podľa cytogenetickej aberácie.



Pacienti s del 13q ako sólo aberáciou a s normálnym karyotypom majú priaznivú prognózu (**nízke riziko**) oproti pacientom s del 11q a del 17p (**vysoké riziko**), ktorí neodpovedajú adekvátne na konvenčnú liečbu a rýchlo progredujú. Pacientov s trizómiou 12 a 6q- radíme do **intermediárneho rizika**. Pri progresii ochorenia pozorujeme klonovú evolúciu – detekujeme novovzniknuté del 11q a del 17 p – ako príznak nestability genómu (11).

Expresia CD 38 na leukemických lymfocytoch bol prvý marker, ktorý javil iniciálne koreláciu s mutačným stavom – táto väzba ale nie je tesná a jeho expresia v priebehu ochorenia kolíše. Takisto stanovenie hranice „pozitivity“ je kontroverzné – v štúdiách – 5 %, 7 %, 20 % a 30 %.

Rozsiahle analýzy génov pomocou mikročipov (microarrays) odhalili medzi mutovanou a nemutovanou CLL **ZAP 70 (Zeta chain associated protein of 70kd)** ako prakticky jediný gén so signifikantne rozdielnou expresiou: väčšina mutovaných CLL je ZAP negatívna (nízke riziko), nemutovaná CLL je prevažne **ZAP pozitívna (vysoké riziko)**. Problémom stanovenia prietokovou cytometriou je nízky stupeň štandardizácie, prah stanovenia je 20 %. Počas trvania ochorenia je stabilným parametrom, javí relatívne tesnú koreláciu s mutačným stavom. Diskordantné prípady charakterizuje iný nepriaznivý biologický marker, napríklad del 17p, del 11q alebo V3-21 expresia. Podľa niektorých autorov je lepším prediktorom progresie ako mutačný stav (10).

Všeobecne v rámci klinickej praxi sa štandardne mutačný stav, ZAP 70 a CD 38 nestanovuje.

Individuálna prognóza pacienta s CLL je extrémne variabilná: od indolentného ochorenia, ktoré neovplyvňuje prežívanie, po rýchly priebeh s krátkym prežívaním napriek liečbe.

5-ročné prežívanie celej skupiny pacientov je 73 %.

Tradičné zlé prognostické faktory

- pokročilé ochorenie pri diagnóze (Rai, Binet) – základ prognózy
- vysoká hodnota a krátky zdvojovací čas lymfocytov (LDT)
- difúzna infiltrácia kostnej drene
- atypická morfológia
- mužské pohlavie
- vysoké sérové hladiny β 2-mikroglobulínu, LD, TK a solubilného CD 23

Literatúra

1. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. WHO Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17(12): 3835–3849.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56: 106–130.
3. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103: 4389–4395.
4. Dighiero G. CLL Biology and prognosis. *American Society of Hematology – Education book* 2005: 278–284.
5. Chiorazzi N, Ferrarini M. Evolving view of the in-vivo kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *American Society of Hematology – Education book* 2006: 273–278.
6. Adam Z, Vorlíček J et al. Chronická B lymfocytárna leukémia. Grada Publishing 2001: Hematologie II – přehled maligních hematologických nemocí: 311–338.
7. Morrison VA. Management of infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukemia. *American Society of Hematology – Education book* 2007: 332–338.
8. Cheson B, Bennett JM, Grever M et al. National Cancer Institute-Sponsored Working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised Guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87(12): 4990–4997.
9. 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(12): 5446–5456.
10. Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *American Society of Hematology – Education book* 2006: 279–284.
11. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4634–4641.

Klinické zlé prognostické faktory

- < 12 mesiacov do nutnosti zahájenia liečby od stanovenia diagnózy
- < 6 mesiacov do relapsu po fludarabíne alebo rezistencia na fludarabín
- „len“ PR po fludarabíne

Nové prognostické faktory

- cytogenetické abnormality
- mutačný stav imunoglobulínových génov variabilnej časti ťažkého reťazca (IgVH)
- expresia tyrozínkinázy ZAP-70
- expresia povrchového CD 38

Iné vyšetrenia

Imunohematologické vyšetrenie – zistiť pozitívitu autoprotilátok bez klinických symptómov AIHA.

Infektologické vyšetrenie – odlišenie reaktívnej lymfocytozy.

Histologické vyšetrenie LU alebo tkaniva – pri aberantnom fenotype je indikovaná histologická lymfatickej uzliny; u pacientov mladších ako 40 rokov je nutná dôkladná diferenciálna diagnóza medzi jednotlivými lymfoproliferáciami – odlišiť leukemizované iné typy NHL.

MUDr. Eva Mikušková

OKHT - Internej kliniky NOÚ
Klenová 1, 833 10 Bratislava
e-mail: eva.mikusкова@nou.sk