

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu**



lek. med. Magdalena Matuszak

**Znaczenie rokownicze wybranych parametrów klinicznych i laboratoryjnych
u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową**

Rozprawa doktorska

Promotor:

prof. dr hab. med. Krzysztof Lewandowski

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych
Układu Krwiotwórczego

Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

(kierownik: prof. dr hab. med. Mieczysław Komarnicki)

Poznań 2011

*Panu Profesorowi dr hab. med. Krzysztofowi Lewandowskiemu
składam serdeczne podziękowania
za opiekę naukową, wsparcie, cenne rady,
wrozumiałość i wszechstronną pomoc*

*Panu Profesorowi dr hab. med. Mieczysławowi Komarnickiemu
składam serdeczne podziękowania
za życzliwość*

*Koleżankom i Kolegom z Przyklinicznych Pracowni Hematologicznych,
a w szczególności z Pracowni Cytometrii Przepływowej i Cytogenetyki
serdecznie dziękuję
za pomoc w wykonaniu części badań*

*Koleżankom i Kolegom
podziękowania
za zrozumienie i życzliwość*

Magdalena Matuszak

Spis treści

I WSTĘP	6
I.1 Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa – dane ogólne	6
I.2 Epidemiologia B-CLL	7
I.3 Czas przeżycia chorych.....	9
I.4 Manifestacja kliniczna choroby	9
I.5 Kryteria rozpoznania i progresji choroby	10
I.6 Zmiany w podstawowych badaniach laboratoryjnych.....	11
I.7 Klasyfikacja zaawansowania klinicznego choroby.....	14
I.8 Prognozowanie dalszego przebiegu choroby u pacjentów z B-CLL	15
I.8.1 Aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH), stężenie β_2 -mikroglobuliny, aktywność kinazy tymidynowej	16
I.8.2 Obecność anomalii cytogenetycznych	17
I.8.3 Rearanżacja regionu zmiennego genu kodującego łańcuchy ciężkie immunoglobulin – IgH (<i>IgV_H</i>).....	18
I.8.4 Ekspresja CD38	19
I.8.5 Ekspresja ZAP70	20
I.8.6 Nowe czynniki o potencjalnym znaczeniu prognostycznym u chorych z B-CLL... 22	
I.8.6.1 Dipeptydylopeptydaza IV/CD26 – wiadomości wstępne	22
I.8.6.2 Gen dipeptydylopeptydazy IV/CD26 – lokalizacja chromosomowa i struktura	23
I.8.6.3 Struktura aminokwasowa i budowa przestrzenna dipeptydylopeptydazy IV/CD26	24
I.8.6.4 Lokalizacja komórkowa dipeptydylopeptydazy IV/CD26	24
I.8.6.5 Funkcja biologiczna dipeptydylopeptydazy IV/CD26.....	25
I.8.6.6 Rola dipeptydylopeptydazy IV/CD 26 w patogenezie nowotworów.....	28
I.8.6.7 Inhibitory dipeptydylopeptydazy IV/CD26	29
I.8.6.8 Znaczenie prognostyczne oceny ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 u chorych z chłoniakami T – i B – komórkowymi.....	30
II CEL PRACY	31
III MATERIAŁ I METODY BADAŃ.....	32
III.1 Charakterystyka grupy badanej	32
III.2 Materiał do badań.....	38
III.3 Metody	38
III.3.1 Ocena ekspresji antygeny CD26, CD38, CD19, CD5, CD23 na powierzchni komórek białaczkowych.....	38
III.3.2 Ocena ekspresji ZAP70 na komórkach białaczkowych	39
III.3.3 Interpretacja uzyskanych wyników ekspresji antygenów metodą cytometrii przepływowowej	40
III.3.4 Ocena aktywności dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi	40
III.3.5 Pomiar stężenia β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi	41
III.3.6 Ocena obecności aberracji cytogenetycznych w komórkach B-CLL techniką FISH (<i>ang. fluorescent in situ hybridization</i>)	41
III.4 Analiza statystyczna	43
IV WYNIKI BADAŃ	45
IV.1 Wyniki oznaczeń laboratoryjnych	45
IV.1.1 Morfologia krwi, ocena morfologiczna komórek rozmazu krwi obwodowej oraz szpiku kostnego	45

IV.1.2 Ocena odsetka komórek wykazujących ekspresję określonych antygenów na komórkach B-CLL metodą cytofluorymetrii przepływowej.....	45
IV.1.2.1 CD38	46
IV.1.2.2 ZAP70	49
IV.1.2.3 Dipeptydylopeptydaza IV/CD26.....	51
IV.1.3 Ocena aktywności dehydrogenazy kwasu mlekowego w surowicy krwi	54
IV.1.4 Ocena stężenia β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi	54
IV.1.5 Ocena obecności aberracji cytogenetycznych w komórkach B-CLL	55
IV.2 Ekspresja dipeptydylopeptydazy IV (CD26) na komórkach białaczkowych a inne uznane czynniki rokownicze u pacjentów z B-CLL	59
IV.2.1 Ekspresja CD26 na powierzchni komórek B-CLL ($CD5^+CD19^+CD23^+$) a kliniczny okres zaawansowania choroby wg klasyfikacji Rai	59
IV.2.2 Ekspresja CD26 na powierzchni komórek B-CLL ($CD5^+CD19^+CD23^+$) a aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) w surowicy krwi.....	61
IV.2.3 Ekspresja CD26 na powierzchni komórek białaczkowych $CD5^+CD19^+CD23^+$ a stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi.....	63
IV.2.4 Ekspresja antygenu CD26 na powierzchni komórek B-CLL ($CD5^+CD19^+CD23^+$) a ekspresja ZAP70.....	65
IV.2.5 Ekspresja antygenu CD26 a ekspresja antygenu CD38 na powierzchni komórek białaczkowych ($CD5^+CD19^+CD23^+$)	67
IV.2.6 Związek ekspresji dipeptydylopeptydazy IV (CD26) na komórkach białaczkowych z obecnością innych uznanych czynników rokowniczych.....	67
IV.3 Ekspresja dipeptydylopeptydazy IV (CD26) na komórkach białaczkowych a inne parametry kliniczne u chorych z B-CLL.....	68
IV.3.1 Ekspresja CD26 a płeć	68
IV.3.2 Ekspresja CD26 a progresywna postać choroby.....	68
IV.3.3 Ekspresja CD26 a czas do włączenia terapii przeciwnowotworowej (TTT)	70
IV.3.4 Ekspresja CD26 a śmiertelność.....	70
IV.4 Analizy przeżycia.....	70
IV.4.1 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oraz włączenia leczenia cytostatycznego oznaczone za pomocą krzywej dla całej grupy badanych z B-CLL – analiza za pomocą krzywych Kaplana-Meiera.....	71
IV.4.2 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów z progresywną i nie-progresywną postacią choroby oznaczone za pomocą krzywej Kaplana-Meiera	74
IV.4.3 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów $CD5^+CD19^+CD23^+CD26^+$ oraz $CD5^+CD19^+CD23^+CD26^-$ oznaczone za pomocą krzywej Kaplana-Meiera	75
IV.4.4 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów w poszczególnych stadiach zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai oznaczone za pomocą krzywej Kaplana-Meiera	76
IV.4.5 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów wymagających leczenia przeciwnowotworowego przed i po upływie 12 miesięcy od rozpoznania.....	77
IV.5 Pozostałe analizy.....	78
IV.5.1 Analiza zależności pomiędzy zmiennymi tworzącymi nowe hipotetyczne grupy rokownicze chorych z B-CLL. Analiza skupień przeprowadzona metodą aglomeracji oraz metodą k-średnich.	78
IV.5.2 Analiza związku pomiędzy obecnością del 11q22-23, del 13q14.3 i del 17p13 w komórkach B-CLL a liczbą komórek $CD5^+CD19^+CD23^+CD26^+$	82
IV.5.3 Porównanie wybranych parametrów laboratoryjnych w grupie pacjentów $CD26^+$ i $CD26^-$	83

SPIS TREŚCI

IV.5.4 Czas do włączenia leczenia (TTT).....	84
IV.5.5 Analiza pozostałych czynników rokowniczych.....	84
V DYSKUSJA.....	86
VI WNIOSKI	95
VII ANEKS	96
VII.1 Wykaz skrótów	96
VII.2 Wykaz tabel	101
VII.3 Wykaz rycin.....	102
VIII PIŚMIENNICTWO	111
IX STRESZCZENIE	122
X SUMMARY	125

I WSTĘP

I.1 Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa – dane ogólne

Nowotwory wywodzące się z limfocytów B stanowią najliczniejszą grupę chorób limfoproliferacyjnych. Schorzenia te cechuje różnorodna manifestacja kliniczna, a także zmienna wrażliwość na zastosowane leczenie. Od wielu lat podejmowane są liczne próby klasyfikacji nowotworów limfoproliferacyjnych. Wiele z nich oparto o wyniki badań histopatologicznych zmienionych chorobowo tkanek i narządów. Podejmowane są jednocześnie próby powiązania uzyskanych wyników badań histopatologicznych w poszczególnych postaciach nowotworów B-komórkowych z indywidualnym przebiegiem procesu chorobowego, wrażliwością na leczenie, a także rokowaniem odległym. Odzwierciedleniem tych prób jest wiele systemów klasyfikacyjnych opracowanych w ostatnich 30 latach, takich jak m.in. klasyfikacja kilońska, Rappaporta, Working Formulation, klasyfikacja WHO czy też REAL. We wszystkich z wymienionych systemów klasyfikacyjnych wyodrębniono chłoniaka limfocytowego, a także jego szczególną postać – przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową (B-CLL).

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa jest schorzeniem limfoproliferacyjnym o charakterze akumulacyjnym, w którym dochodzi do gromadzenia długo żyjących zmienionych nowotworowo limfocytów B we krwi, szpiku kostnym oraz obwodowych narządach limfatycznych. Pod względem klinicznym B-CLL charakteryzuje się zwiększeniem bezwzględnej liczby limfocytów we krwi obwodowej, względną limfocytozą szpiku kostnego, postępującym powiększeniem węzłów chłonnych, wątroby i śledziony. W naturalnym przebiegu choroby dochodzi także do upośledzenia odporności komórkowej i humoralnej na skutek zakłócenia procesu kooperacji limfocytów B i T.

Rozpoznanie przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej opiera się na stwierdzeniu obecności we krwi obwodowej monoklonalnej populacji limfocytów B w ilości $>5000/\mu\text{l}$ oraz zajęcia przez komórki B-CLL szpiku kostnego ($>30\%$ komórek jądrzastych szpiku o charakterystycznym immunofenotypie). Jak dotąd opinie dotyczące konieczności równoczesnej oceny histopatologicznej węzła chłonnego u chorych z B-CLL w przypadkach typowych są rozbieżne [1-3].

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa jest chorobą o bardzo zróżnicowanym przebiegu klinicznym, zmiennym nasileniu objawów chorobowych, a także różnym stopniu zaawansowania klinicznego choroby w chwili jej rozpoznania. Wynika to z faktu bezobjawowego przebiegu schorzenia u niektórych osób i przypadkowego rozpoznawania B-CLL w chwili okresowo przeprowadzonego badania kontrolnego. B-CLL cechują również indywidualnie zmienny czas od momentu rozpoznania choroby do włączenia terapii, różna odpowiedź na zastosowane leczenie, a także różna trwałość uzyskanej w wyniku terapii odpowiedzi [4]. W części przypadków zaawansowanie zmian chorobowych w chwili rozpoznania jest niewielkie. U niektórych chorych nie stwierdza się wykładników progresji choroby nawet w ciągu wielu lat obserwacji. U innych schorzenie już od momentu rozpoznania ma charakter progresywny doprowadzając w stosunkowo krótkim czasie do nasilonej limfadenopatii i organomegalii [5-7].

Zaobserwowano, że około 30% chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową nie wymaga leczenia. W grupie tej zgon jest najczęściej niezwiązany z aktywnością choroby. Podobny odsetek pacjentów nie wymaga terapii w początkowym okresie choroby, ze względu na jej stabilny przebieg i brak dolegliwości podmiotowych. U pozostałych chorych (również około 30%) przebieg procesu chorobowego od momentu ustalenia rozpoznania jest progresywny. W przypadkach tych natychmiastowe wdrożenie leczenia wydaje się być niezbędne [2,7-9]. Pomimo licznych prób, jak dotąd nie udało się ustalić optymalnego sposobu postępowania terapeutycznego w tej grupie chorych. Podejmowane są jednak próby indywidualizowania terapii w zależności od wieku, stopnia zaawansowania klinicznego choroby, stanu ogólnego pacjenta oraz obecności lub braku zmian klinicznych i laboratoryjnych przepowiadających dalszy korzystny lub niekorzystny przebieg schorzenia.

I.2 Epidemiologia B-CLL

B-CLL jest najczęściej występującym chłoniakiem w krajach Europy Zachodniej [5], a także w Stanach Zjednoczonych [4]. Według danych epidemiologicznych B-CLL stanowi 11% wszystkich nowotworów hematologicznych i 30-40% wszystkich białaczek. Częstość występowania B-CLL wynosi średnio jeden przypadek na 100000 osób [10-11]. Zachorowalność na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową wynosi 3,9

przypadków na 100000 osób z populacji ogólnej na rok. Mężczyźni chorują dwukrotnie częściej niż kobiety. Choroba występuje częściej u rasy białej niż czarnej i żółtej [12].

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa dotyczy częściej osób starszych. Średni wiek w chwili zachorowania wynosi 72 lata [13], natomiast mediana wieku 55 lat. Ostatnio obserwuje się tendencję do wzrostu częstości zachorowań na B-CLL wśród osób młodszych [14]. Częstość rozpoznawania B-CLL istotnie zmieniała się na przestrzeni ostatnich lat. Hansen w obszernej publikacji z 1973 roku opartej na długoterminowej obserwacji 189 pacjentów wykazał, że zachorowalność na B-CLL wynosiła 5,5 w 1949 roku, 6,6 w latach 1943 – 1952 i 6,4 w okresie 1958 – 1961 na 100000 osób z populacji ogólnej na rok [15]. W 1964 roku zachorowalność na B-CLL wzrosła do 7,8 na 100000 mieszkańców na rok. Rozpoznanie choroby w tym okresie nie były jednak oparte na szczegółowej diagnostyce immunofenotypowej, a przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową rozpoznawano w przypadku stwierdzenia limfocytozy we krwi powyżej 10000/ μ l i obecności małych limfocytów w rozmazie krwi obwodowej. Niewłaściwość takiego postępowania potwierdziły dopiero badania retrospektywne. Okazało się bowiem, że u części pacjentów w okresie późniejszym zrewidowano rozpoznanie na chłoniaka śledzionowego strefy brzeżnej, chłoniaka z komórek płaszczka, chłoniaka grudkowego, czy też białaczkę prolimfocytową T-komórkową. Fakt ten tłumaczy spadek zachorowalności na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową w latach dziewięćdziesiątych w porównaniu do lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku. W 1991 roku Sgambati i wsp. potwierdzili spadek zachorowalności na B-CLL w populacji ogólnej w latach 1973 - 1976 z 4,2 do 3,2 i z 3,8 na 2,6 na 100000 osób na rok odpowiednio wśród białych mężczyzn i kobiet. W tym samym okresie zachorowalność na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową wśród Afroamerykanów, Hiszpanów i Azjatów utrzymywała się na znacząco niższym poziomie [16]. Przyczyna tych różnic w zachorowalności nie została jak dotąd jednoznacznie wyjaśniona.

Kolejnym czynnikiem mogącym mieć istotny wpływ na ocenę zachorowalności na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową jest dostęp do specjalistów. Tezę tą potwierdzili Cartwright i wsp. w latach 1984 – 1988 w oparciu o analizę wyników morfologii krwi pacjentów z terenu Wielkiej Brytanii. W badaniach tych wyniki morfologii krwi poddano ocenie specjalistów hematologów. Umożliwiło to identyfikację nowych chorych z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową we wczesnym stadium choroby. Przypadki te nie były wcześniej rozpoznane przez lekarzy rodzinnych. W wyniku tak przeprowadzonej oceny zachorowalność wzrosła do 5,54 na 100000 osób z populacji ogólnej na rok, a stosunek zachorowań wśród mężczyzn do zachorowań u kobiet określono na

1,95. Badanie to potwierdziło także wyższą częstość zachorowań na B-CLL wśród osób starszych [17].

Istotnym czynnikiem warunkującym częstość rozpoznawania przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej były zmieniające się na przestrzeni lat kryteria rozpoznania B-CLL. I tak, w roku 1989 podejrzenie choroby wysuwano w przypadkach limfocytozy przekraczającej $5 \times 10^9/L$, a w latach późniejszych $10 \times 10^9/L$. W kolejnych latach wprowadzono następne zmiany. W roku 1996 ponownie za kryterium rozpoznania B-CLL przyjęto wzrost liczby limfocytów $>5 \times 10^9/L$, a w roku 2008 ustalono, że wzrost ten musi dotyczyć limfocytów B [16]. W roku 2002 Rawston i wsp. na podstawie oceny immunofenotypu leukocytów krwi obwodowej osób powyżej 40. roku życia wykazali, że u 3,5% badanych osób „zdrowych” obecna jest populacja komórek podobnych fenotypowo do komórek B-CLL [18]. Późniejsze dane oparte o bardziej czułe techniki diagnostyczne potwierdziły obecność wymienionych zaburzeń u 12% osób badanych. Dane te stały się podstawą hipotezy o możliwym związku pomiędzy obecnością we krwi monoklonalnej limfocytozy B-komórkowej i następnym wystąpieniem przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej. Hipoteza ta jak dotąd nie znalazła jednoznacznego potwierdzenia [16].

I.3 Czas przeżycia chorych

Przeciętny czas życia chorych na B-CLL od momentu rozpoznania do zgonu wynosi 5 – 8 lat. Potwierdzono jednak bardzo znaczące różnice w przeżyciu poszczególnych chorych w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego wg Rai w momencie rozpoznania choroby (Tabela 1, str. 14). I tak, chorzy w 0 stopniu zaawansowania klinicznego choroby żyją średnio powyżej 150 miesięcy, w I stopniu – 101 miesięcy, w II stopniu – 71 miesięcy, w III i IV stopniu jedynie 19 miesięcy [19]. Ocena przeżycia odległego w grupie pacjentów poniżej 50. roku życia, leczonych lekami alkilującymi potwierdziła skrócenie przewidywanego czasu przeżycia o 19 lat w porównaniu do osób ze zdrowej populacji [7, 20].

I.4 Manifestacja kliniczna choroby

Rozpoznanie przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej w dużej części przypadków ma charakter przypadkowy. Najczęściej jest rezultatem analizy wyników badań okresowych. U części chorych przebieg B-CLL przez wiele lat ma charakter

bezoobjawowy, a pierwszą manifestacją choroby jest pojawienie się tzw. „objawów ogólnych” (występują u około 5 - 10% chorych). Należą do nich podwyższona temperatura ciała bez cech infekcji, nasilona potliwość, zwłaszcza nocna, istotny spadek masy ciała ($\geq 10\%$ w ciągu ostatnich 6 miesięcy i utrzymujący się ponad dwa tygodnie) oraz znacznego stopnia osłabienie lub męczliwość. W momencie rozpoznania choroby u około 20% pacjentów z B-CLL nie stwierdza się odchyień w badaniu przedmiotowym. U około 80% chorych dochodzi do niebolesnego powiększenia węzłów chłonnych obwodowych. Stopień nasilenia limfadenopatii obwodowej może być różny. W niektórych przypadkach stwierdza się obecność uogólnionej, niewielkiej limfadenopatii. U innych chorych dochodzi do rozwoju masywnej limfadenopatii, z tendencją do tworzenia pakietów, uciskających sąsiednie narządy. U około 50% chorych ma miejsce powiększenie śledziony, a u 15% powiększenie wątroby. Masywna organomegalia może prowadzić do pojawienia się objawów dyskomfortu lub uczucia pełności w jamie brzusznej. U niektórych chorych z B-CLL stwierdza się występowanie objawów związanych z nasiloną cytopenią we krwi obwodowej (niedokrwistość, granulocytopenia, małopłytkowość). Do najczęstszych z nich należą nawracające infekcje oraz powikłania krwotoczne. Wskutek współwystępowania zaburzeń odpowiedzi humoralnej i komórkowej powikłania infekcyjne są najczęstszą przyczyną zgonu chorych na B-CLL. Powikłania te mogą mieć etiologię zarówno bakteryjną, wirusową (np. Herpes zoster) jak i grzybiczą [2,21]. Rzadko przyczyną zgonu jest wyniszczenie nowotworowe. W przypadkach tych stwierdza się obecność nacieków z komórek nowotworowych w płucach, opłucnej, tkankach miękkich, skórze i innych narządach [2,22].

I.5 Kryteria rozpoznania i progresji choroby

Według aktualnych kryteriów rozpoznanie przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej opiera się na stwierdzeniu obecności monoklonalnej populacji limfocytów krwi obwodowej w ilości $\geq 5 \times 10^9/L$ oraz infiltracji szpiku kostnego komórkami limfoidalnymi ($>30\%$ komórek jądrzastych szpiku). W przypadkach typowych komórki te wykazują ekspresję $CD19^+$, $CD20^+$ bright, $CD5^+$, $CD23^+$, $CD79a^+$, $CD43^+$, słabą ekspresję powierzchniowych immunoglobulin IgM i IgD z obecnością łańcuchów lekkich kappa lub lambda. Wykazują także słabą ekspresję lub brak ekspresji $FMC7^-$, $CD10^-$, $CD79b^-$. Kryterium dodatkowym niezbędnym do rozpoznania B-CLL jest utrzymywanie się limfocytozy przez okres co najmniej 3 miesięcy. Rozpoznanie B-CLL można postawić

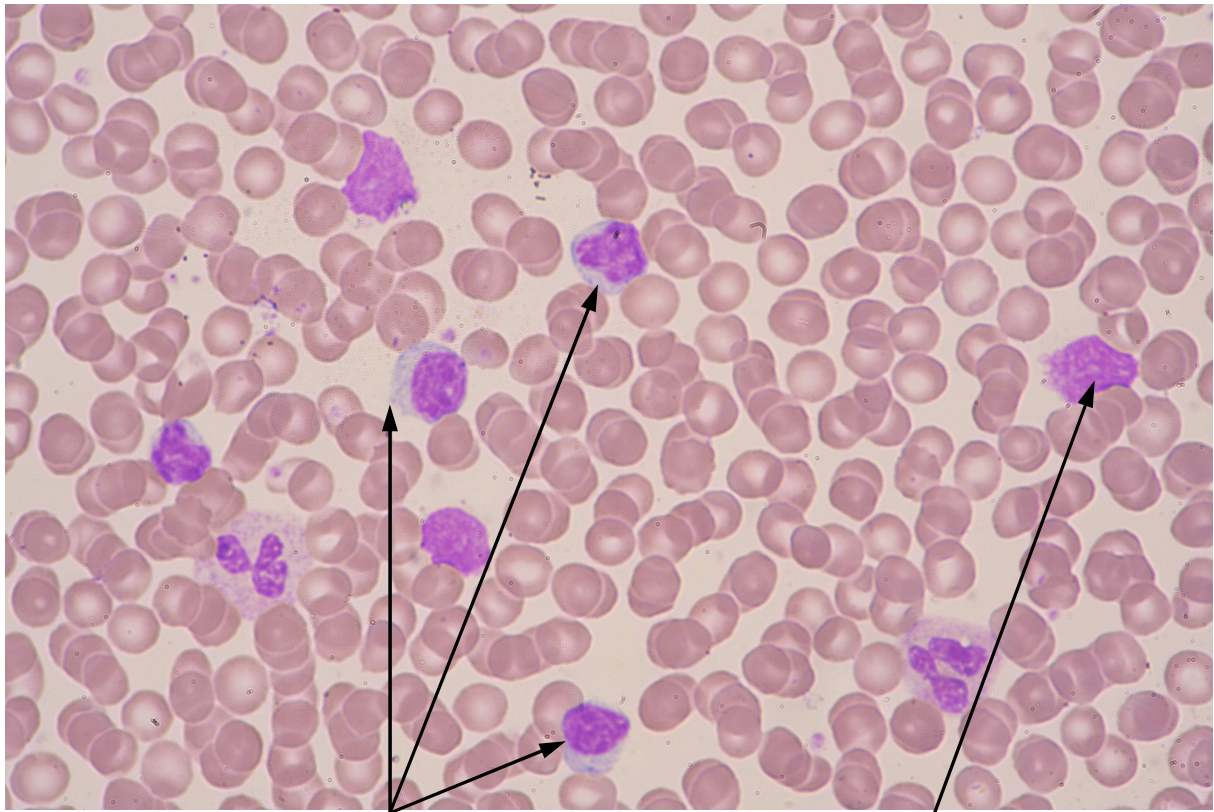
również u osób z niższą liczbą monoklonalnych limfocytów B we krwi, ale jedynie w przypadkach z obecną cytopenią, bądź z towarzyszącymi objawami ogólnymi [2,3].

Progresywną postać choroby należy rozpoznać w przypadku, gdy dochodzi do dynamicznego narastania masy guza, wystąpienia objawów niewydolności hematopoezy, nawracających infekcji, obecności nasilonych objawów ogólnych, takich jak spadek masy ciała, gorączka $>38^{\circ}\text{C}$, zlewne poty i postępujące osłabienie. O niepomyślnym przebiegu choroby świadczyć może zdwojenie limfocytozy w czasie krótszym niż 12 miesięcy, jej wzrost o 50% w stosunku do wartości w chwili rozpoznania oraz transformacja do chłoniaka o wyższym stopniu złośliwości [2,3].

I.6 Zmiany w podstawowych badaniach laboratoryjnych

W przypadkach typowych liczba leukocytów we krwi waha się od $10 \times 10^9/l$ do powyżej $100 \times 10^9/l$. W rozmazie krwi obwodowej wśród krwinek białych dominują małe dojrzałe limfocyty ze skąpą cytoplazmą. Ponadto obecne są liczne cienie Gumprechta będące pozostałościami po rozpadłych limfocytach (Rycina 1) [2].

Rycina 1. Typowy obraz mikroskopowy rozmazu krwi obwodowej pacjenta z B-CLL.
Barwienie H+E. Powiększenie 400x



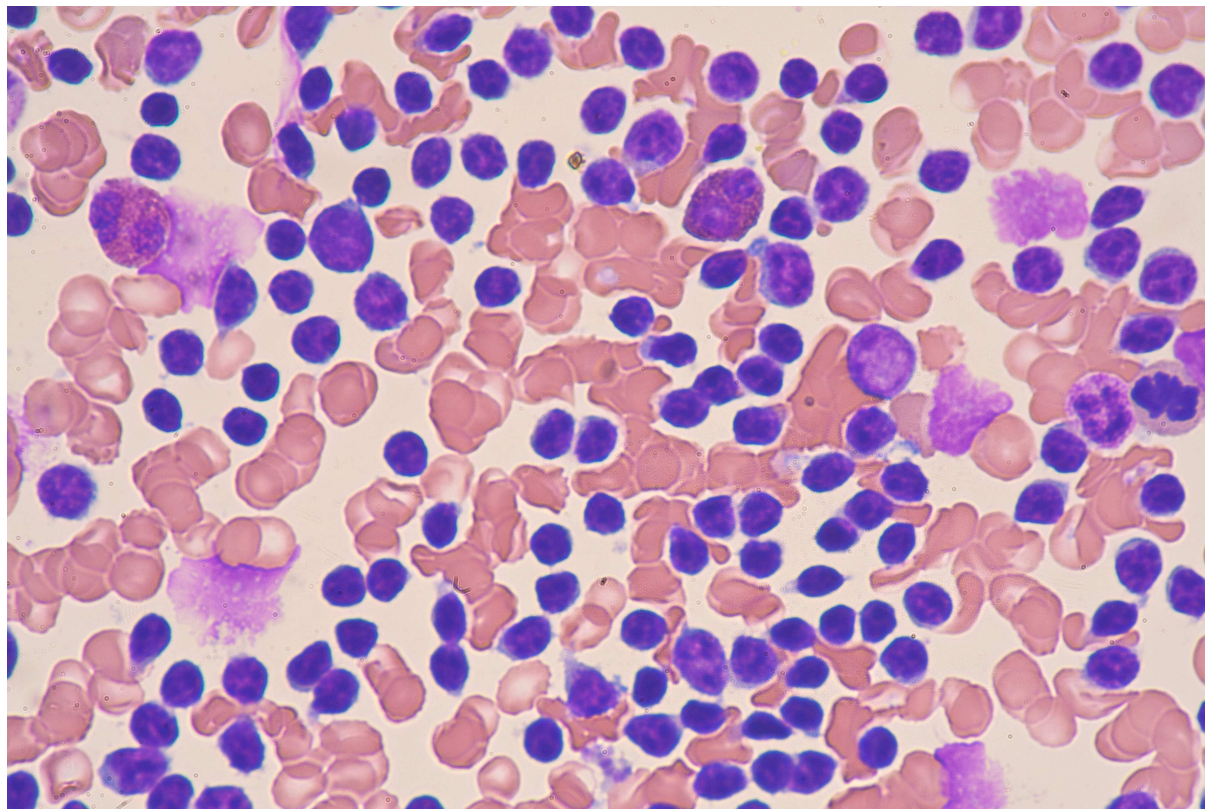
Komórki chłoniakowe
B-CLL

„cień komórkowy”
Gumprechta

Rycina 2. Typowy obraz mikroskopowy rozmazu szpiku kostnego pacjenta z B-CLL.

Barwienie H+E. Powiększenie 400x

Zwraca uwagę obecność około 90% komórek o skąpej cytoplazmie i morfologii małego limfocyta.



W rozmazie krwi mogą występować także pojedyncze prolimfocyty z wyraźnym jądrem. W badaniu cytologicznym szpiku kostnego zawartość limfocytów przekracza 30% wszystkich komórek jądrzastych. W większości przypadków są to małe nagojądrzaste limfocyty, a ich odsetek mieści się w przedziale 70 – 90 %. Limfocytozie szpiku często towarzyszy względne zmniejszenie ilości komórek z pozostałych linii komórkowych (czerwonokrwinkowej, granulocytarnej i płytkotwórczej) (Rycina 2). W badaniu histologicznym szpiku kostnego u chorych z B-CLL można wykazać nacieczenie małymi, dojrzałymi limfocytami. Sposób naciekania struktur hematopoetycznych może mieć charakter guzkowy, śródmiąższowy bądź rozlany (dyfuzyjny). Ten ostatni według niektórych autorów ma niekorzystne znaczenie prognostyczne [2].

U części chorych wyniki podstawowych badań biochemicznych krwi mogą nie odbiegać od normy. U niektórych pacjentów stwierdza się jednak podwyższoną aktywność

dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH), podwyższone stężenie β_2 -mikroglobuliny, niski poziom gamma-globulin. U niewielkiego odsetka chorych (około 1 – 1,5 %) obecne są objawy niedokrwistości autoimmunohemolitycznej (hiperbilirubinemia pośrednia, podwyższona aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego, obniżone stężenie haptoglobiny, retykulocytoza, dodatni bezpośredni lub pośredni odczyn Coombsa) [2].

I.7 Klasyfikacja zaawansowania klinicznego choroby

Ocenę zaawansowania zmian chorobowych u pacjentów z B-CLL przeprowadza się w oparciu o jeden z dwóch systemów klasyfikacyjnych (według Rai oraz według Bineta). Pierwszy z nich, wyodrębniający pięć okresów zaawansowania zmian chorobowych, został zaproponowany przez Rai i wsp. w 1975 r. (Tabela 1, str. 14) [2,6,7].

Tabela 1. Klasyfikacja zaawansowania klinicznego przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej wg Rai i wsp.

Okres	Objawy	Czas przeżycia
0	Limfocytoza krwi obwodowej ($>15.000/\text{mm}^3$) i szpiku ($>40\%$)	>150 miesięcy
I	Limfocytoza jak w stadium 0 i powiększenie węzłów chłonnych	100 miesięcy
II	Limfocytoza jak w stadium 0 i powiększenie wątroby i/lub śledziony i/lub powiększenie węzłów chłonnych	70 miesięcy
III	Limfocytoza jak w stadium 0 i niedokrwistość ($\text{Hb} < 11 \text{ g/dl} - 6,83 \text{ mmol/l}$)	20 miesięcy
IV	Limfocytoza jak w stadium 0 i małopłytkowość ($\text{Pt} < 100.000/\text{mm}^3$)	20 miesięcy

Drugi system klasyfikacyjny został zaproponowany w roku 1981 przez Bineta i wsp. Wyodrębnia on trzy okresy zaawansowania choroby (A, B, C) w zależności od ilości zajętych grup węzłowych w badaniu przedmiotowym, wartości stężenia hemoglobiny i liczby płytek krwi (Tabela 2, str. 15) [2,7].

Tabela 2. Klasyfikacja zaawansowania klinicznego przewlekłej białaczki limfocytowej B - komórkowej według Bineta

Okres	Objawy	Czas przeżycia
A	< niż 3 powiększone grupy węzłowe zajęte przez proces nowotworowy bez niedokrwistości (Hb \geq 6,21 mmol/l, 10 g/dl) i małopłytkowości	> 120 miesięcy
B	\geq 3 powiększone grupy węzłowe zajęte przez proces nowotworowy bez niedokrwistości (Hb \geq 6,21 mmol/l, 10 g/dl) i małopłytkowości	60 miesięcy
C	Niedokrwistość (Hb < 6,21 mmol/l 10 g/dl) i/lub małopłytkowość (Pt < 100.000/mm ³)	24 miesiące

Wymienione systemy oceny zaawansowania zmian chorobowych u chorych na B-CLL opierają się na analizie wyników podstawowych badań laboratoryjnych i badania przedmiotowego. Obie klasyfikacje wyróżniają wczesny (Rai 0, Binet A), pośredni (Rai I-II, Binet B) i zaawansowany okres choroby (Rai III-IV, Binet C) [23].

I.8 Prognozowanie dalszego przebiegu choroby u pacjentów z B-CLL

Systemy klasyfikacji klinicznej przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej zostały zaproponowane ponad 25 lat temu. Do dnia dzisiejszego są one

przydatne dla oceny zaawansowania choroby. Ułatwiają również podejmowanie decyzji leczniczych, a także porównywanie skuteczności poszczególnych metod terapii w określonych stadiach zaawansowania procesu chorobowego. Pomimo ich niewątpliwej przydatności praktycznej obarczone są jednak także wadami. Najważniejszą z nich jest znaczne zróżnicowanie w poszczególnych przypadkach dalszego przebiegu klinicznego choroby oraz odmienna wrażliwość na zastosowane leczenie. Na ich podstawie nie można również zidentyfikować pacjentów, u których dojdzie do szybkiej progresji procesu chorobowego, a także tych, u których choroba będzie miała charakter stabilny.

W ostatnich latach nieustannie podejmowane są wysiłki zmierzające do identyfikacji czynników prognostycznych przepowiadających przebieg choroby już w momencie rozpoznania B-CLL. Jak dotąd wykazano, że niezależną wartością prognostyczną w chwili rozpoznania choroby ma liczba limfocytów we krwi obwodowej, stopień nacieczenia szpiku kostnego, odsetek atypowych komórek limfoidalnych krwi obwodowej oraz czas zdwojenia liczby limfocytów (krótszy lub dłuższy niż 12 miesięcy). Parametry te są proste do określenia i stanowią wartościowe uzupełnienie oceny aktywności choroby w indywidualnych przypadkach [8,24,25].

W ostatnich latach zidentyfikowano szereg nowych czynników prognostycznych, których wartość kliniczna systematycznie rośnie. Wśród nich należy wymienić markery surowicze, takie jak aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego, stężenie β_2 -mikroglobuliny, aktywność kinazy tymidynowej, zawartość w surowicy rozpuszczalnego receptora CD23 czy też CD44. Niektóre z nich rzadko są jednak wykorzystywane dla potrzeb rutynowej diagnostyki hematologicznej, głównie z powodu trudności metodologicznych oraz utrudnionego dostępu do badań [26]. Okazało się także, że duże znaczenie praktyczne w przewidywaniu dalszego przebiegu choroby ma również obecność w komórkach B-CLL określonych zaburzeń cytogenetycznych oraz aberracji molekularnych (np. stan mutacyjny genu dla łańcucha ciężkich immunoglobulin) czy też stwierdzenie wysokiej ekspresji błonowej antygenu CD38 lub komórkowej ZAP70.

I.8.1 Aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH), stężenie β_2 -mikroglobuliny, aktywność kinazy tymidynowej

Lee i wsp. wykazali, że wysoka aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego we krwi pacjentów z B-CLL wykazuje korelację ze skróceniem przeżycia [27]. Okazało się

także, że wysoka aktywność LDH jest powiązana z wysoką ekspresją CD38 i ZAP70 oraz obecnością delekcji 17p w komórkach nowotworowych.

Również wysokie stężenie β_2 -mikroglobuliny we krwi okazało się być niezależnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z B-CLL. Wykazano bowiem, że jej poziom we krwi jest powiązany z masą guza, stopniem nacieczenia przez komórki białaczkowe szpiku kostnego oraz ze stadium zaawansowania klinicznego choroby [28-30]. Potwierdzono również zależność pomiędzy stężeniem β_2 -mikroglobuliny we krwi a ekspresją CD38 na komórkach B-CLL oraz cytoplazmatyczną ekspresją ZAP70 w komórkach białaczkowych [31,32].

Także aktywność kinazy tymidynowej (TK1), markera nasilenia proliferacji komórek klonu białaczkowego, jest w sposób niezależny powiązana z rokowaniem u chorych z B-CLL. Matthews i wsp. wykazali, że poziom TK1 we krwi pozostaje w związku z okresem zaawansowania klinicznego choroby oraz z krótkim czasem do wystąpienia objawów progresji choroby [33]. W jednej z ostatnich publikacji Konoplev i wsp. wykazali, że wysokie stężenie TK1 w surowicy krwi powiązane jest z krótkim przeżyciem całkowitym, stanem mutacyjnym regionu zmiennego genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin, ekspresją ZAP70 oraz CD38 na komórkach białaczkowych, a także ryzykiem transformacji B-CLL do chłoniaka o wyższym stopniu złośliwości (zespół Richtera) [34].

I.8.2 Obecność anomalii cytogenetycznych

Występowanie określonych zaburzeń cytogenetycznych w komórkach B-CLL ma znaczenie prognostyczne. Ich obecność w badaniu metodą FISH wykazano aż u 80% pacjentów z B-CLL [35-37]. Do najczęściej występujących należą delekcja 13q14, delekcja 11q22-23, delekcja 17p13, trisomia chromosomu 12 oraz delekcja 6q [38,39].

Delekcja 11q22-23 obecna jest u około 10-20% chorych z B-CLL. Istotą tego defektu jest delekcja obszaru chromosomu zawierającego gen ATM (ataxia teleangiectasia mutated). Wykazano także, że prawdopodobne znaczenie rokownicze u pacjentów z B-CLL mają również mutacje genu ATM [40], których obecność jest powiązana z szybką progresją objawów choroby, obecnością masywnej limfadenopatii, złą odpowiedzią na zastosowane leczenie, a także z krótszym okresem przeżycia (około 80 miesięcy) [41].

Delekcja 17p13 jest obecna u około 8-10% pacjentów z B-CLL w momencie rozpoznania choroby i u około 30% chorych z opornością na leczenie cytostatyczne. Aberacja

ta, podobnie jak 11q22-23, należy do niekorzystnych zmian cytogenetycznych u pacjentów z B-CLL. Istotą defektu jest utrata genu supresorowego wzrostu guza (p53, ang. tumor suppressor gene). Obecność delecji powiązana jest z szybką progresją objawów choroby, złą odpowiedzią na leczenie za pomocą analogów puryn oraz leków alkilujących, a także krótkim czasem przeżycia (około 30 miesięcy) [24,42,43].

I.8.3 Rearanżacja regionu zmiennego genu kodującego łańcuchy ciężkie immunoglobulin – IgH (*IgV_H*)

Analiza genetyczna chorych z B-CLL wykazała, że w zależności od pochodzenia białaczkowych limfocytów B o fenotypie CD19⁺/CD5⁺ możliwe jest wyodrębnienie dwóch postaci klinicznych choroby. Ich rozróżnienie jest możliwe dzięki ocenie stanu mutacyjnego regionu zmiennego genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin – IgH (*IgV_H*). I tak typ I (przedzarodkowy) choroby cechuje obecność niezmutowanego, a typ II (pozarodkowy) obecność zmutowanego regionu zmiennego dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IgV_H*). Obecność niezmutowanego genu *IgV_H* powiązana jest z gorszym rokowaniem w porównaniu do przypadków ze zmutowanym regionem zmiennym *IgV_H*. Pacjenci z niezmutowanym *IgV_H* mają zwykle także bardziej zaawansowany okres kliniczny choroby w chwili rozpoznania. Częściej występują u nich także inne niekorzystne aberracje cytogenetyczne. U osób tych szybciej także dochodzi do konieczności włączenia terapii, a czas całkowitego przeżycia jest wyraźnie krótszy w porównaniu do pacjentów ze zmutowanym *IgV_H* [7,24].

U pacjentów z B-CLL ze zmutowanym genem *IgV_H* w chwili rozpoznania choroby stwierdza się zwykle wczesne stadium zaawansowania klinicznego choroby wg klasyfikacji Rai lub Bineta. Często można u nich także wykazać obecność delecji 13q14. Z reguły nie obserwuje się natomiast zmian w obrębie chromosomu 17p (w tym delecji genu supresorowego wzrostu nowotworu p53). Chorzy ci nie wymagają zwykle także natychmiastowego rozpoczęcia terapii, a ich przeżycie całkowite jest względnie długie [7].

I.8.4 Ekspresja CD38

Antygen błonowy CD38 jest cząsteczką pełniącą funkcję receptora błonowego. Cząsteczka CD38 jest jednołańcuchową glikoproteiną typu II o ciężarze cząsteczkowym 45kDa. Cechuje ją zdolność do agregacji i tworzenia dimerów oraz tetrametrów. Posiada właściwości enzymatyczne cykazy ADP-rybozylowej. Ekspresję CD38 wykazano na limfocytach B i T, na komórkach NK, monocytach oraz komórkach dendrytycznych. Poziom ekspresji CD38 zmienia się istotnie w zależności od stadium różnicowania komórki. Dzięki swoim właściwościom enzymatycznym CD38 odgrywa istotną rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak podział, proliferacja, odnowa populacji komórek macierzystych czy wydzielanie neuroprzekaźników. CD38 przewodzi sygnały wewnątrzkomórkowe inicjujące syntezę cytokin, aktywację i proliferację komórek, a także ich apoptozę [44].

Podczas rozwoju limfocytów B ekspresja CD38 jest ściśle regulowana. I tak, na komórkach prekursorowych w szpiku kostnym ekspresja CD38 jest wysoka. Jego ekspresja na limfocytach B krwi obwodowej jest natomiast niska, a na komórkach plazmatycznych wywodzących się z limfocytów B ponownie wysoka. Właśnie z tych powodów przyjmuje się, że stopień ekspresji antygeny CD38 jest powiązany ze stopniem dojrzałości limfocytów B [44].

W świetle ostatnich danych, wydaje się, że CD38 odgrywa kluczową rolę w supramolekularnym kompleksie obejmującym receptory pośredniczące w przekazywaniu sygnału komórkowego, receptory dla chemokin, cząsteczki adhezyjne oraz metaloproteazy matrix komórkowego. Wykazano bowiem, że ekspresja CD38 w obrębie białek wymienionego kompleksu jest powiązana z bardziej wydajnym przekazywaniem sygnału komórkowego, chemotaksją oraz homingiem. Z tych powodów sugeruje się, że CD38 jest cząsteczką integrującą sygnały proliferacyjne i migracyjne komórek [45].

W 1999 roku Damle i wsp. wykazali, że ekspresja błonowa antygeny CD38 na komórkach B-CLL jest ściśle związana ze stanem mutacyjnym genów *IgV_H*. W badaniu tym okazało się, że u chorych z niezmutowanym genem *IgV_H* i ekspresją CD38 na ponad 30% komórek nowotworowych choroba ma przebieg agresywny, a ich czas przeżycia jest krótki. Przeciwnie, w grupie pacjentów ze zmutowanym genem *IgV_H* i ekspresją CD38 na mniej niż 30% komórek klonu B-CLL przebieg choroby jest łagodny, a ich czas całkowitego przeżycia relatywnie długi [44]. Ostatnio opublikowane dane wyraźnie wskazują, że ekspresja CD38 na komórkach B-CLL ma niezależną wartość prognostyczną. Wykazano bowiem, że u pacjentów z ekspresją CD38<30% rokowanie jest lepsze w porównaniu z grupą chorych z ekspresją

przekraczającą 30% [46]. Udokumentowano także, że u chorych z B-CLL ekspresja CD38 jest powiązana z czasem całkowitego przeżycia, czasem do progresji choroby, czasem do włączenia terapii oraz z odpowiedzią na zastosowane leczenie [44].

Dane dotyczące korelacji pomiędzy ekspresją CD38 na komórkach B-CLL a obecnością rearanżacji genu *IgV_H* oraz aktywnością kinazy tymidynowej w surowicy krwi są rozbieżne. Wykazano bowiem, że u części pacjentów ekspresja CD38 zmienia się w czasie, niezależnie od postępu procesu chorobowego, aktywności kinazy tymidynowej w surowicy krwi i stanu *IgV_H* [7].

I.8.5 Ekspresja ZAP70

Białko ZAP70 jest kodowane przez gen o tej samej nazwie zlokalizowany w chromosomie 1. Jest enzymem pełniącym funkcję niereceptorowej białkowej kinazy tyrozynowej związanej z łańcuchem zeta o ciężarze właściwym 70kDa (zeta-chain-associated protein kinase 70) [47], zidentyfikowanym u chorych z B-CLL po raz pierwszy za pomocą techniki DNA microarray, w trakcie poszukiwania genów powiązanych ze stanem mutacyjnym *IgV_H*. Wkrótce potem Crespo i wsp. wprowadzili technikę cytometrii przepływowej dla oceny ekspresji ZAP70 na powierzchni komórek B-CLL, określając jednocześnie wartość progu detekcji dla wymienionej metody na 20% [48]. Dzięki jej zastosowaniu Schroers i wsp. wykazali związek pomiędzy ekspresją ZAP70 a agresywnym przebiegiem choroby [49]. Potwierdzono także zależność pomiędzy ekspresją ZAP70 a skróceniem średniego czasu całkowitego przeżycia i to niezależnie od początkowego stopnia zaawansowania klinicznego choroby [11,18,50-53]. Aktualnie, pomimo rozbieżności przyjmuje się, że ekspresja CD38 na komórkach B-CLL nie podlega zmianie w trakcie naturalnego przebiegu choroby [54,55].

Listę starych i nowych czynników prognostycznych, ułatwiających przewidzenie dalszego przebiegu choroby oraz podejmowanie decyzji terapeutycznych u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową przedstawiono w Tabeli 3 (str. 21).

Tabela 3. Zidentyfikowane niezależne czynniki przepowiadające dalszy przebieg procesu chorobowego u pacjentów na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową [24]

Czynnik rokowniczy	Korzystne rokowanie	Niekorzystne rokowanie
Okres zaawansowania klinicznego		
- wg Binet'a	A	B, C
- wg Rai	0	I, II, III, IV
Infiltracja szpiku kostnego w ocenie		
- trepanobiopatu	Naciek nie dyfuzyjny	Naciek dyfuzyjny
- cytologicznej	≤ 80% limfocytów	> 80% limfocytów
Leukocytoza	≤ 50 x 10 ⁹ /l	> 50 x 10 ⁹ /l
Odsetek prolimfocytów we krwi obwodowej	≤ 10%	> 10%
Czas podwojenia liczby limfocytów	> 12 miesięcy	≤ 12 miesięcy
Markery surowicze: aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) stężenie β ₂ -mikroglobuliny aktywność kinazy tymidynowej limfocytów ekspresja CD23 na komórkach białaczkowych	Prawidłowe	Podwyższone
Aberracje cytogenetyczne	Kariotyp prawidłowy Izolowana del (13q)	del (11q) del (17p)
Ekspresja CD38 na komórkach białaczkowych	≤ 30 %	> 30%
Stan regionu zmiennego genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin (<i>IgV_H</i>)	Zmutowany	Niezmutowany
Ekspresja ZAP70 na komórkach białaczkowych	Niska (≤ 20%)	Wysoka (> 20 %)

I.8.6 Nowe czynniki o potencjalnym znaczeniu prognostycznym u chorych z B-CLL

I.8.6.1 Dipeptydylopeptydaza IV/CD26 – wiadomości wstępne

Związane z błoną komórkową enzymy o właściwościach proteolitycznych uczestniczą między innymi w procesach końcowej degradacji białek. Odgrywają również istotną rolę w wielu innych procesach fizjologicznych, takich jak morfogeneza tkanek i narządów, ich różnicowanie, a także ich obumieranie, czyli apoptoza. Niektóre z nich uczestniczą również w procesie przekazywania sygnału komórkowego [56-59].

Jednym z takich enzymów jest ektoproteaza serynowa – dipeptydylopeptydaza IV/CD26 [60-64]. Jej obecność w ludzkiej wątrobie została po raz pierwszy potwierdzona w 1966 roku dzięki badaniom Hopsu-Havu i Glenner'a [65-67]. W 1977 roku Schrader and Stacy udowodnili, że dipeptydylopeptydaza IV/CD26 posiada właściwości białka wiążącego deaminazę adenozyiny (*ang. ADAbp – adenosine deaminase binding or complexing protein*) [60,61]. W 1993 roku Houghton i Schlossman niezależnie przypisali dipeptydylopeptydazie IV akronim CD26 [65]. Szczegółowe analizy wykazały, że CD26 jest glikoproteiną powierzchniową o masie cząsteczkowej 110 kD i wewnętrznej aktywności enzymatycznej dipeptydylopeptydazy IV [68]. Jak dotychczas rola biologiczna CD26 pozostaje nie do końca poznana [63,67].

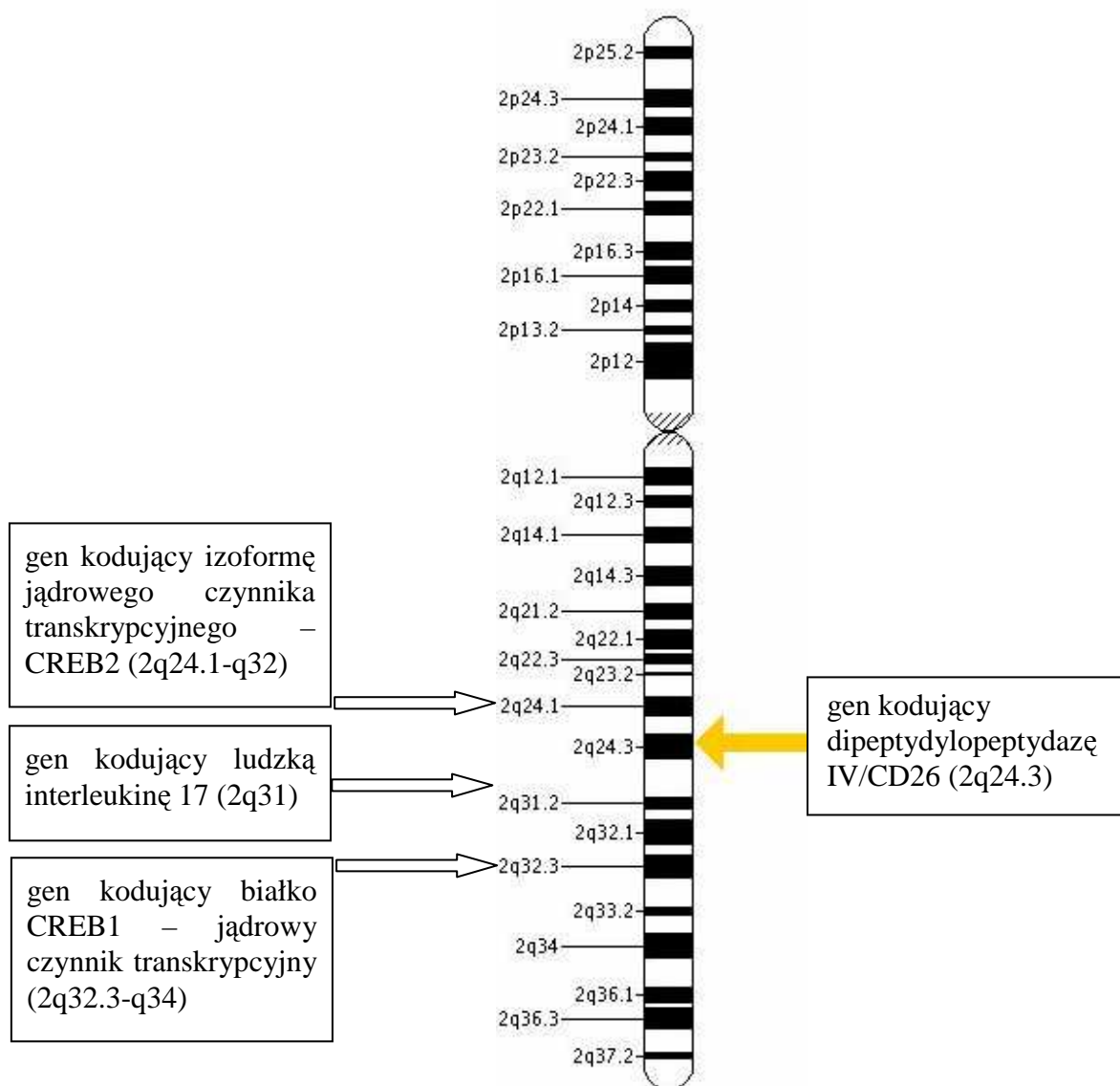
W warunkach fizjologicznych dipeptydylopeptydaza IV/CD26 jest obecna na powierzchni ponad 60% prawidłowych limfocytów krwi obwodowej [60,63,69]. Białko to pełni wiele funkcji biologicznych. Najwięcej danych dotyczy roli dipeptydylopeptydazy IV/CD26 w mechanizmach regulujących odpowiedź immunologiczną [64,67,70]. Dipeptydylopeptydaza IV/CD26 uczestniczy w procesach aktywacji i proliferacji limfocytów T oraz w interakcjach pomiędzy komórkami prezentującymi antygen a limfocytami T [57,61, 65]. Wysoką ekspresję antygeny powierzchniowego CD26 wykazano bowiem w subpopulacji limfocytów Th1 po ekspozycji na różne antygeny [68].

Aktualne dane sugerują, że dipeptydylopeptydaza IV/CD26 odgrywa istotną rolę w patogenezie niektórych nowotworów hematologicznych, szczególnie agresywnych chłoniaków T-komórkowych. Znaczenie obecności dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na powierzchni komórek nowotworów wywodzących się z limfocytów B jest mniej poznane [60,67].

I.8.6.2 Gen dipeptydylopeptydazy IV/CD26 – lokalizacja chromosomowa i struktura

Analiza pełnej sekwencji DNA wykazała, że gen *DPP4* kodujący białko dipeptydylopeptydazę IV/CD26 składa się z 26 egzonów, 766 aminokwasów oraz 2301 nukleotydów ($766 \times 3 + 1$ kodon stop = 2301). Gen *DPP4* jest zlokalizowany na chromosomie 2q24.3. (Rycina 3) [62]. Produkt białkowy genu *DPP4* wykazuje aktywność proteazy tylko w postaci homodimeru. Monomery białka nie mają natomiast właściwości enzymatycznych [64,70].

Rycina 3. Lokalizacja genu *DPP4* oraz genów w chromosomie 2 (2q24.3).



I.8.6.3 Struktura aminokwasowa i budowa przestrzenna dipeptydylopeptydazy IV/CD26

Dipeptydylopeptydaza IV/CD26 jest białkiem powierzchniowym o masie cząsteczkowej 110 kD i aktywności egzopeptydazy [65,67,70]. Należy ona do sialoglikoprotein wewnątrz błonowych typu II. Występuje zwykle w formie dimerycznej o ciężarze cząsteczkowym (220 kD) [60,61,63]. Każda podjednostka składa się z dwóch domen: domeny α/β o aktywności hydrolazy i ośmioskrydłowej domeny β (aminokwasy 55–497) tworzącej strukturę śmigłową. Domena α/β znajduje się najbliżej błony komórkowej (aminokwasy 39-51 i 506-766). W jej obrębie obecna jest tzw. aktywna triada – Ser630, Asp708 oraz His740 [62,64,66].

Centrum aktywne enzymu to obszar pomiędzy I i II śmigłem. Dochodzi w nim do proteolitycznej degradacji substratów na dwa fragmenty. Struktura śmigłowa dipeptydylopeptydazy IV/CD26 zakrywa częściowo centrum aktywne enzymu, co prowadzi do ograniczenia dostępu do centrum aktywnego enzymu dla niektórych potencjalnych substratów [70,71].

I.8.6.4 Lokalizacja komórkowa dipeptydylopeptydazy IV/CD26

Dipeptydylopeptydaza IV/CD26 została po raz pierwszy wyizolowana z wątroby szczura w 1993 roku. Nieco później okazało się, że występuje ona również w wielu innych tkankach zwierzęcych, w tym w ludzkich komórkach łożyska, kory nerek, dróg moczowych, nasienia, a także w limfocytach. Najwyższą aktywność dipeptydylopeptydazy IV/CD26 wykazano w komórkach nabłonka cewek bliższych nerek oraz rąbka szczoteczkowego nabłonka jelita cienkiego. Wysoką zawartość dipeptydylopeptydazy IV/CD26 potwierdzono również w błonach komórkowych kanalików żółciowych oraz w błonach lizosomalnych [56,62]. Jej obecność udokumentowano także na powierzchni wielu komórek nabłonkowych i śródbłonkowych, fibroblastów oraz aktywowanych limfocytów T, limfocytów B, dojrzałych tymocytów, komórek NK, makrofagów i komórek wyściółki zatok śledziony [61,63,66]. Obecność dipeptydylopeptydazy IV/CD26 wykazano na różnych typach komórek, w tym na komórkach gruczołu krokowego, nerek, wątroby, a także płuc i jelita cienkiego. Niska błonowa ekspresja dipeptydylopeptydazy IV/CD26 jest typowa dla nieaktywowanych (spoczynkowych) limfocytów T i komórek NK. Po ich aktywacji dochodzi

do gwałtownego wzrostu ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 [56,65,67]. Limfocyty B cechuje bardzo niska spoczynkowa ekspresja dipeptydylopeptydazy IV/CD26. Także w tym przypadku w wyniku ich aktywacji dochodzi do wyraźnego wzrostu ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 [60,66].

I.8.6.5 Funkcja biologiczna dipeptydylopeptydazy IV/CD26

Podstawową aktywnością enzymatyczną dipeptydylopeptydazy IV/CD26 jest udział w reakcjach odcinania NH₂-końcowych dipeptydów z białek i małych polipeptydów, w których w przedostatniej pozycji łańcucha polipeptydowego obecna jest prolina, alanina lub hydroksyprolina (Xaa-Pro lub Xaa-Ala) (Tabela 4, str. 26) [62-64,66,70]. Wiązania te są zwykle odporne na działanie większości innych proteaz. Substratem dla dipeptydylopeptydazy IV są niektóre chemokiny, czynniki wzrostu, integryny czy neuropeptydy. Dipeptydylopeptydaza IV/CD26 uczestniczy także w procesie przyswajania niektórych białek przez enterocyty rąbka szczoteczkowego przewodu pokarmowego [64,65].

Tabela 4. Peptydy będące substratem dla dipeptydylopeptydazy IV/CD 26 [65].

Rodzina substratu	Peptyd	Efekt biologiczny
Inkretyny i hormony żołądkowo-jelitowe	GLP-1	Inaktywacja
	GLP-2	Inaktywacja
	GIP	Inaktywacja
	Glucagon	Inaktywacja
	PACAP	Inaktywacja
	GRP	Nieznany
	Peptide YY	Zmiana w powinowactwie do receptorów
Peptydy wazoaktywne	Bradykinina	Zmiana w powinowactwie do receptorów
	VIP	Inaktywacja
	BNP	Zmiana w powinowactwie do receptorów
Neuropeptydy	NPY	Zmiana w powinowactwie do receptorów
	Beta-casomorphins	Inaktywacja
Chemokiny	CCL3	Zmiana w powinowactwie do receptorów Zwiększenie aktywności
	CCL4	Zmiana w powinowactwie do receptorów
	CCL5	Zmiana w powinowactwie do receptorów
	CCL11	Inaktywacja
	CCL22	Zmiana w powinowactwie do receptorów
	CXCL6	Brak wpływu
	CXCL9	Inaktywacja
	CXCL10	Inaktywacja
	CXCL11	Inaktywacja
	CXCL12	Inaktywacja

Postuluje się, że dipeptydylopeptydaza IV/CD26 bierze także udział w metabolizmie glukozy [62,64-66].

Duże zainteresowanie wzbudziły dane dotyczące udziału dipeptydylopeptydazy IV/CD26 w procesach interakcji międzykomórkowych. Okazało się bowiem, że dipeptydylopeptydaza IV/CD26 odgrywa istotną rolę w procesach komunikacji komórek, regulacji ich wzrostu, adhezji i migracji. Prawdopodobnie jest to wynikiem interakcji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 z proteinami macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. extracellular matrix - ECM*), takimi jak kolagen oraz fibronektyna. Z tego powodu nie można wykluczyć, że dipeptydylopeptydaza IV/CD26 odgrywa także istotną rolę w procesie migracji oraz ekspansji komórek nowotworowych [66,70].

Wykazano, że dipeptydylopeptydaza IV/CD26 uczestniczy również w szeregu innych ważnych procesów biologicznych, w tym między innymi w niehydrolitycznych interakcjach międzycząsteczkowych z plazminogenem oraz w procesie interakcji z glikoproteiną o masie cząsteczkowej 120 kDa otoczki wirusa HIV. Dipeptydylopeptydaza IV/CD26 wykazuje także właściwości białka wiążącego deaminazę adenozyne (*ang. adenosine deaminase binding or complexing protein - ADAbp*) [60,61,65,66].

Dipeptydylopeptydaza IV/CD26 prawdopodobnie zakłóca mechanizmy adhezji komórkowej pośredniczone przez fibronektynę, deaminazę adenozyne oraz kolagen. Najnowsze badania potwierdzają istnienie coraz większej ilości molekuł posiadających właściwości enzymatyczne dipeptydylopeptydazy IV/CD26. Cechują się one podobną strukturą polipeptydową. Spostrzeżenie to doprowadziło do zdefiniowania nowej grupy wielofunkcyjnych molekuł o homologicznej strukturze i aktywności dipeptydylopeptydazy IV/CD26 (*ang. „dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologous: DASH*). Postuluje się, że molekuly z rodziny DASH pełnią funkcję regulatorową. Dzieje się tak z powodu ich interakcji z rozpuszczalnymi mediatorami wzrostu. Potwierdzają to także wyniki badań oceniających obecność i rolę molekuł z rodziny DASH u pacjentów z chorobami nowotworowymi [65,66].

U ludzi obok klasycznej formy dipeptydylopeptydazy IV/CD26 potwierdzono również występowanie jej glikozylowanego monomeru o podobnych właściwościach enzymatycznych - dipeptydylopeptydazy IV- β . W odróżnieniu od dipeptydylopeptydazy IV/CD26, dipeptydylopeptydaza IV- β nie ma jednak zdolności wiązania deaminazy adenozyne (ADA). Ekspresję tej formy enzymu jak dotąd wykazano na komórkach hematopoetycznych i limfoidalnych [66].

W ostatnim czasie okazało się także, że oprócz postaci związanej z błoną komórkową, w surowicy krwi obecna jest forma rozpuszczalna CD26 (*ang. soluble CD26, sCD26*) [60,67]. Ta forma białka ma budowę zbliżoną do antygeny powierzchniowego CD26. Jej obecność potwierdzono w wielu płynach ustrojowych, w tym w osoczu, surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie stawowym, nasieniu oraz moczu [65,68].

Aktywność enzymatyczna postaci sCD26 została opisana po raz pierwszy przez grupę badaczy japońskich w 1968 roku. Funkcja biologiczna sCD26 nie jest do końca poznana [65]. Wyniki najnowszych badań przypisują postaci rozpuszczalnej dipeptydylopeptydazy IV/CD26 trzy funkcje biologiczne. Enzym ten uczestniczy w procesie rozwoju stanu zapalnego poprzez aktywację i inaktywację niektórych chemokin, a także w pierwszych etapach odpowiedzi immunologicznej [62,64]. Rozpuszczalna postać dipeptydylopeptydazy IV/CD26 bierze również udział w wiązaniu lub inaktywacji aktywnych biologicznie białek krwi, w tym naczyniowych peptydów regulatorowych (np. substancji P, bradykininy), czynników wzrostu oraz hormonów. Przypuszcza się, że rozpuszczalna forma dipeptydylopeptydazy IV/CD26 uczestniczy także w procesie onkogenezy, w tym w procesie rozsiewu nowotworowego [65].

I.8.6.6 Rola dipeptydylopeptydazy IV/CD 26 w patogenezie nowotworów

Szereg peptydów regulujących procesy wzrostu komórkowego jest zbudowanych z łańcucha aminokwasowego zawierającego prolinę w pozycji 2 od końca. Należą do nich neuropeptyd Y (NPY), peptyd YY (PYY), hormon uwalniający hormony wzrostu, substancja P (SP), peptyd podobny do glukagonu 1,2 (*ang. GLP 1,2 - glucagon-like peptide 1,2*), peptyd uwalniający gastrynę, chemokiny i interleukiny (IL-2, IL-6). Wszystkie z nich wydają się wywierać wpływ regulacyjny na proces wzrostu komórek nowotworowych (Correll, 2005) [66].

Analiza stopnia ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 wykazała, że jej ekspresja zmienia się w czasie w zależności od rodzaju analizowanych linii komórkowych. I tak, do spadku ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na powierzchni komórek linii T dochodzi u chorych z przewlekłą białaczką limfocytową T-komórkową, ostrą białaczką szpikową (Kondo et al., 1996) oraz pacjentów z nowotworami jamy ustnej [56]. U chorych z

ostrą białaczką limfoblastyczną T-komórkową potwierdzono natomiast wzrost ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 [61].

Wysoką ekspresję dipeptydylopeptydazy IV/CD26 wykazano również na powierzchni komórek nowotworowych agresywnych chłoniaków T-komórkowych. Spostrzeżenie to nie dotyczy jednak skórnych chłoniaków T-komórkowych w tym ziarniniaka grzybiastego i zespołu Sezary'ego. W wymienionych postaciach chłoniaków nowotworowe limfocyty T nie wykazują lub wykazują jedynie śladową ekspresję dipeptydylopeptydazy IV/CD26. W przypadkach tych udokumentowano także obniżoną aktywność rozpuszczalnej postaci enzymu. Na podstawie dotychczas zgromadzonych danych postuluje się, że utrata antygenu CD26 z powierzchni limfocytów T przepowiada wystąpienie objawów zespołu Sezary'ego lub innego chłoniaka skórno T – komórkowego [60,63,67].

I.8.6.7 Inhibitory dipeptydylopeptydazy IV/CD26

Przedstawione właściwości biologiczne dipeptydylopeptydazy IV/CD26 stały się powodem podjęcia badań nad lekami hamującymi jej aktywność. Dotychczas opracowane inhibitory dipeptydylopeptydazy IV/CD26 przedłużają czas życia i zwiększają aktywność wielu peptydów, w tym endogennie produkowanej insuliny oraz inkretyn wpływających na jej sekrecję oraz regulację glikemii. Znalazły one zastosowanie w leczeniu chorych z cukrzycą w ramach prospektywnych badań klinicznych [65].

Dotychczas przeprowadzone próby kliniczne II i III fazy dotyczyły zastosowania nieselektywnych inhibitorów dipeptydylopeptydazy IV/CD26 (talabostat) u pacjentów z rakiem płuc, trzustki, jelita grubego i czerniakiem. W 2006 roku rozpoczęto także badanie kliniczne II fazy porównujące skuteczność i bezpieczeństwo stosowania talabostatu i rituximabu u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego według Rai pierwotnie opornych na analogi puryn. Wyniki tego badania nie zostały dotychczas opublikowane [65].

Jak dotąd do stosowania w Unii Europejskiej dopuszczono dwa inhibitory dipeptydylopeptydazy IV/CD26 – sitagliptin produkcji MSD oraz vildagliptin firmy Novartis. Leki te znalazły zastosowanie w leczeniu chorych z cukrzycą typu 2. Ta nowa grupa leków wydłuża czas półtrwania inkretyn (np. *GIP – gastric inhibitory peptide*, *GLP-1 – glucagon-like peptide 1*) indukujących sekrecję insuliny. Wykazano, że ich zastosowanie prowadzi do trwałego zmniejszenia poziomu glikemii w surowicy krwi [65].

**I.8.6.8 Znaczenie prognostyczne oceny ekspresji
dipeptydylopeptydazy IV/CD26 u chorych z chłoniakami T – i B –
komórkowymi**

W 1994 roku Carbone i wsp. wykazali, że ekspresja dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na komórkach nowotworów układu chłonnego jest w zasadzie ograniczona do chłoniaków z dużych anaplastycznych komórek CD30⁺, bez względu na to czy pochodzą one z linii T czy B oraz do komórek innych chłoniaków wywodzących się z linii T. Podobna ocena przeprowadzona w tym czasie przez Andrew i wsp. i niezależnie przez Invernizzi i wsp. nie potwierdziła ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na komórkach przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej. W innych badaniach dotyczących pacjentów z B-CLL ekspresję tą oceniono jako śladową [56].

II CEL PRACY

Celem niniejszej pracy jest ocena znaczenia prognostycznego ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na komórkach białaczkowych u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową. W ocenie tej postanowiono uwzględnić związek ekspresji CD26 z obecnością innych uznanych czynników rokowniczych związanych z niepomyślnym przebiegiem choroby, takich jak wysoka ekspresja CD38, ZAP70, aktywność LDH, stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi czy też obecność określonych aberracji cytogenetycznych (w tym 11q-, 17p-) w komórkach białaczkowych. Niezależnej ocenie postanowiono poddać także związek pomiędzy ekspresją CD26 na komórkach B-CLL a czasem do włączenia leczenia cytostatycznego.

III MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania wykonano po uprzednim uzyskaniu zgody Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (zgoda nr 1037/09 z dnia 03 grudnia 2009 r.).

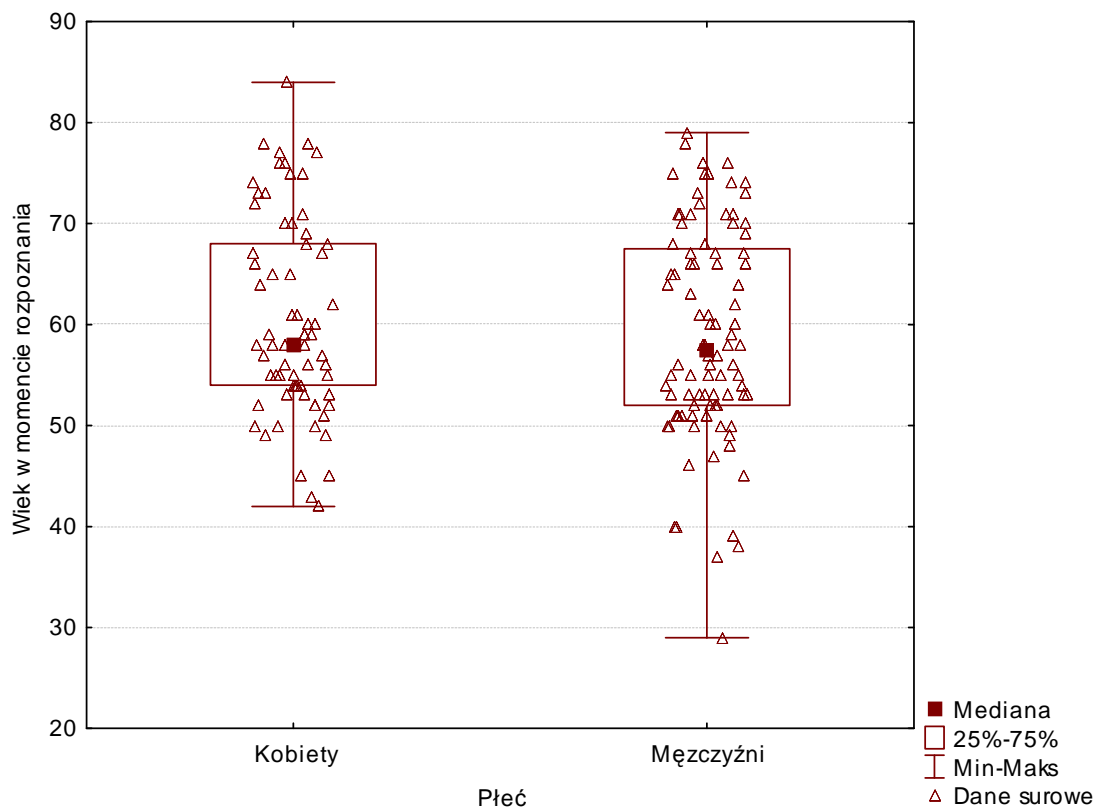
III.1 Charakterystyka grupy badanej

Do badań zakwalifikowano 162 chorych (57% kobiet, 43% mężczyzn) w wieku od 29 do 84 lat (w chwili rozpoznania choroby) z rozpoznaniem przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej. Średnia wieku osób badanych wyniosła 60 lat, natomiast mediana wieku 58 lat. Kobiety i mężczyźni w grupie badanej byli jednorodni pod względem liczebności osób badanych w poszczególnych przedziałach wieku (Tabela 5, str. 32), (Rycina 4, 5, 6).

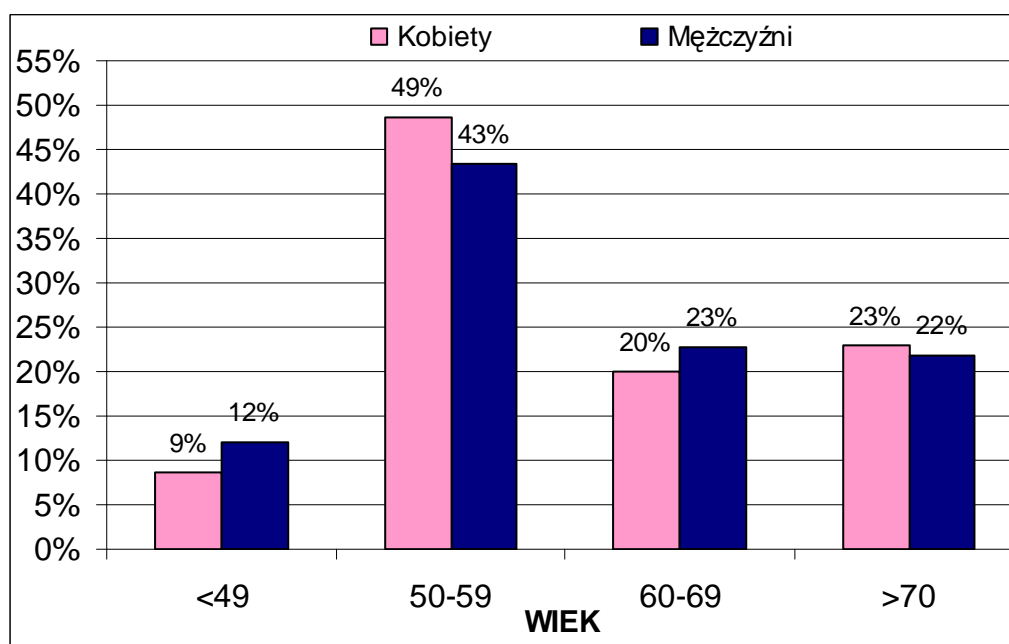
Tabela 5. Charakterystyka wieku osób badanych w chwili rozpoznania choroby z uwzględnieniem płci (n – liczba badanych osób)

Wiek w czasie diagnozy	Mężczyźni n = 92	Kobiety n = 70
$\bar{x} \pm SD$	59 ± 10,550	61 ± 9,781
(min-max)	(29-79)	(42-84)
Me ± SE	58 ± 1,100	58 ± 1,169
(Q ₁ ; Q ₃)	(52 ; 68)	(54 ; 68)

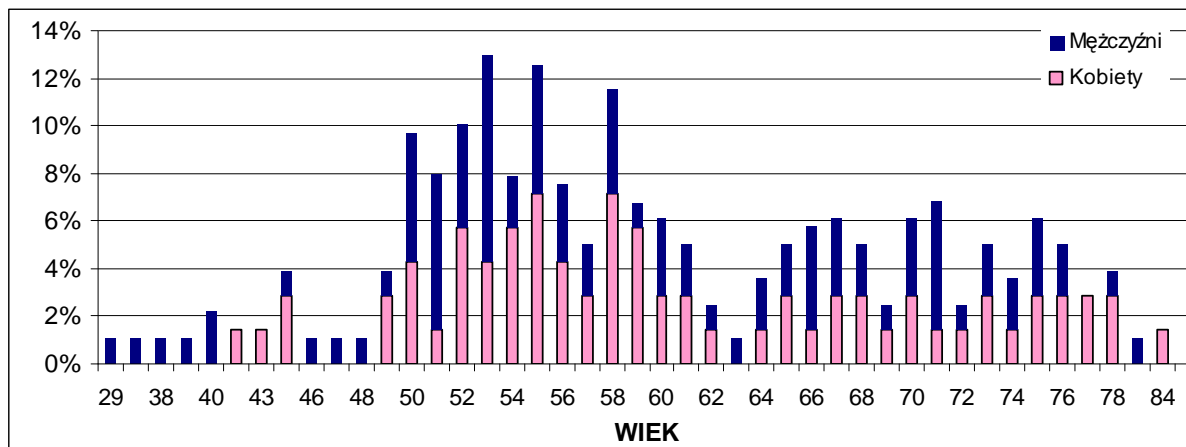
Rycina 4. Wiek osób badanych w chwili rozpoznania choroby z uwzględnieniem płci



Rycina 5. Częstość zachorowań w poszczególnych przedziałach wieku w zależności od płci badanych pacjentów (A)



Rycina 6. Częstość zachorowań w poszczególnych przedziałach wieku w zależności od płci badanych pacjentów (B)



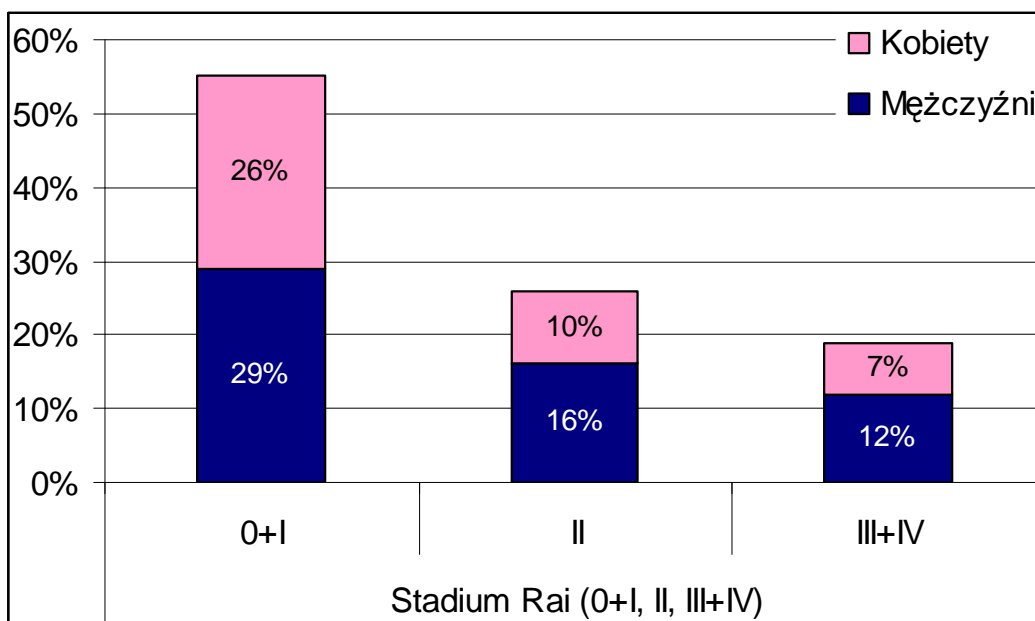
Wszystkie osoby poddane ocenie zostały poinformowane o celu prowadzonych badań. Otrzymały także pisemną informację o rodzaju zaplanowanych analiz, a także o objawach klinicznych, przebiegu i sposobach leczenia B-CLL. Do badań kwalifikowano ostatecznie wyłącznie chorych, którzy wyrazili zgodę na udział w badaniu.

Wszystkich badanych poddano aktywnej obserwacji w Klinice Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego w Poznaniu oraz w Hematologicznych Poradniach Przyklinicznych. Zakres czasu obserwacji dla poszczególnych badanych chorych wyniósł od 8 do 311 miesięcy (mediana 70 miesięcy) (Tabela 6, str. 36), a dla ponad 50% ocenianych osób okres obserwacji mieścił się w przedziale od 50 do 100 miesięcy.

Rozpoznanie przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej ustalono na podstawie kryteriów przedstawionych w rozdziale I.5.

Analizując ocenę zaawansowania klinicznego choroby u poszczególnych badanych stwierdzono, że 32 (20%) pacjentów znajdowało się w 0^0 , 56 (34%) w I^0 , 42 (26%) w II^0 , 13 (8%) w III^0 , a 19 (12%) w IV^0 zaawansowania choroby według Rai (Rycina 7). Ponad połowa chorych (54%) w chwili rozpoznania B-CLL prezentowała początkowy (0 - I) okres zaawansowania zmian według klasyfikacji Rai.

Rycina 7. Stopień zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai w grupie osób poddanych ocenie (n = 162)



70% chorych (n = 113) z grupy poddanej ocenie wymagało włączenia leczenia cytostatycznego w chwili rozpoznania choroby lub w trakcie trwania aktywnej obserwacji (III i IV okres zaawansowania klinicznego według Rai, wystąpienie objawów progresji choroby). Pozostałe 30% badanych (n = 49) do czasu zakończenia analizy nie wymagało rozpoczęcia terapii przeciwnowotworowej.

Wśród osób wymagających terapii 10 chorych znajdowało się w 0, 33 w I, 38 w II, 13 w III, a 19 w IV okresie zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai. W grupie tej (n = 113) czas od rozpoznania choroby do inicjacji leczenia (TTT ang. *time to treatment*) wyniósł średnio 21 miesięcy (mediana 7 miesięcy, zakres 1 – 171 miesięcy) (Tabela 6, str. 36).

W zależności od czasu do podjęcia terapii (TTT; ang.: *time to treatment*) badanych chorych podzielono na dwie grupy:

- z czasem TTT < 12 miesięcy (54%, n = 60)
- z czasem TTT ≥ 12 miesięcy (46%, n = 53).

Tabela 6. Zestawienie podstawowych danych dotyczących populacji badanej, ich czasu obserwacji oraz czasu do podjęcia leczenia

Parametry		$\bar{x} \pm SD$ (min ; max)	Me \pm SE (Q1 ; Q3)
Wiek w momencie rozpoznania (lata)	N=162	59,65 \pm 10,227 (29 ; 84)	58 \pm 0,804 (53 ; 68)
TTT (miesiące)	N=113	20,69 \pm 33,591 (1 ; 171)	7 \pm 3,174 (1 ; 24,5)
Czas obserwacji do 01.04.2011/do zgonu (miesiące)	N=162	78,69 \pm 55,512 (8 ; 311)	70 \pm 4,362 (39 ; 96)

W trakcie trwania badania 10 chorych (6 %) wyłączono z analizy z powodu zgonu będącego wynikiem progresji choroby lub/i wystąpienia powikłań infekcyjnych oraz krwotocznych. Na uwagę również zasługuje fakt, że 8 z nich wymagało włączenia leczenia cytostatycznego przed upływem 12 miesięcy od rozpoznania B-CLL (Tabela 12, str. 104).

Charakterystykę parametrów laboratoryjnych badanej grupy pacjentów przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 7. Charakterystyka badanej grupy chorych w chwili rozpoznania B-CLL (n = 162).
Podstawowe dane laboratoryjne

Parametry	$\bar{x} \pm SD$ (min ; max)	Me \pm SE (Q1 ;Q3)
Bezwzględna liczba leukocytów (G/l) we krwi obwodowej	47,31 \pm 58,202 (5,2 ; 400)	24,6 \pm 5,5 (16,9 ; 53,4)
Bezwzględna liczba limfocytów (G/l) we krwi obwodowej	35,7 \pm 44,507 (1,4 ; 222,5)	19,1 \pm 4,473 (11,3 ; 37,7)
Limfocytoza krwi obwodowej (%)	77,26 \pm 14,131 (39 ; 99)	80 \pm 1,392 (68 ; 87)
Limfocytoza CD5⁺/CD19⁺ (%) we krwi obwodowej	73,56 \pm 15,456 (27,5 ; 98)	76,5 \pm 1,75 (64 ; 85)
Bezwzględna liczba granulocytów obojętnochłonnych (G/l) we krwi obwodowej	4,45 \pm 1,941 (0,6 ; 13)	4,2 \pm 0,199 (3,3 ; 5,3)
Odsetek granulocytów obojętnochłonnych (%) we krwi obwodowej	18,28 \pm 11,948 (0 ; 55)	16 \pm 1,201 (9 ; 25)
Stężenie hemoglobiny (mmol/l) we krwi obwodowej	8,2 \pm 1,295 (2,7 ; 10,5)	8,4 \pm 0,125 (7,8 ; 8,9)
Liczba płytek krwi (G/l) we krwi obwodowej	196,85 \pm 83,506 (29 ; 656)	196,5 \pm 8,035 (151 ; 237)
Limfocytoza szpiku kostnego (%)	71,8 \pm 17,813 (20 ; 98)	75 \pm 2,3 (60 ; 87)
Limfocytoza CD5⁺/CD19⁺ (%) w szpiku kostnym	76,4 \pm 13,921 (40,4 ; 98,5)	80 \pm 2,229 (65,5 ; 87)

III.2 Materiał do badań

Materiałem wyjściowym do przeprowadzenia zaplanowanych badań morfologicznych, biochemicznych, immunofenotypowych i cytogenetycznych była krew obwodowa pozyskana z nakłucia żyły odłokciowej do probówek-strzykawek automatycznych z odpowiednim podłożem.

III.3 Metody

III.3.1 Ocena ekspresji antygeny CD26, CD38, CD19, CD5, CD23 na powierzchni komórek białaczkowych

Ocenę ekspresji antygenów powierzchniowych CD26, CD38, CD19, CD5 i CD23 przeprowadzono metodą cytofluorymetrii przepływowej w cytometrze firmy Canto II Becton-Dickinson. Materiałem wyjściowym do badań było 2 ml krwi obwodowej pobrane do jałowych probówek zawierających K₃EDTA. W kolejnym kroku całość delikatnie mieszano, a pozyskany w ten sposób materiał niezwłocznie przesyłano do laboratorium. W wyjątkowych przypadkach próbki przechowywano w temperaturze 4°C maksymalnie przez okres 24h. Następnie, do opisanych próbek dodawano po 100 µl materiału badanego zawierającego 1x10⁶ leukocytów oraz stosowną objętość odpowiednich przeciwciał: do pierwszej CD19 PerCP Cy 5.5 (20 µl, Becton Dickinson), CD23 APC (5 µl, Becton Dickinson), CD5 FITC (20 µl, Becton Dickinson) oraz CD26 PE (20 µl, BD Pharmingen), do drugiej CD19 PerCP Cy 5.5 (20 µl, Becton Dickinson), CD38 FITC (20 µl, Becton Dickinson). Każdorazowo przygotowano również kontrolę dla oznaczenia CD26. W tym celu do probówki dodano przeciwciała CD19 PerCP Cy 5.5 (20 µl, Becton Dickinson), CD23 APC (5 µl, Becton Dickinson), CD5 FITC (20 µl, Becton Dickinson) oraz IgG1 (10 µl, Alexa Fluor 488 Becton Dickinson). Kontrola izotypowa określała poziom nieswoistego wiązania się danego izotypu immunoglobulin z badanymi komórkami. Służyła ona do ustalenia poziomu fluorescencji pochodzącej od tego typu wiązania. Dzięki temu wyróżniono populację komórek pozytywnych i negatywnych względem danego antygeny. Tak przygotowaną próbkę ponownie delikatnie wytrząsano na mikrowstrząsarce ML-1 (vortex) przez ok. 3-5 sekund,

mieszaniny inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w warunkach ciemni. Następnie, do próbek dodawano 2 ml płynu lizującego erytrocyty, po 10 minutach próbkę odwirowywano i dodawano do niej 1 ml zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej nie zawierającego jonów Ca i Mg (PBS)*. Mieszaninę ponownie odwirowywano, dodawano 0,5 ml PBS i dokładnie mieszano. Tak przygotowany materiał komórkowy poddawano ocenie w ośmiokanałowym cytometrze przepływowym Canto II (firmy Becton Dickinson).†

III.3.2 Ocena ekspresji ZAP70 na komórkach białaczkowych

Materiałem wyjściowym do badań było 2 ml krwi obwodowej pobranej do jałowych próbek zawierających K₃EDTA. W kolejnym kroku całość delikatnie mieszano, a pozyskany w ten sposób materiał niezwłocznie przesyłano do laboratorium. W wyjątkowych przypadkach próbkę przechowywano w temperaturze 4⁰C maksymalnie przez okres 24h. Po wymieszaniu do próbki dodawano 10 µl przeciwciała anty human Mouse ZAP70 Alexa Fluor 488 (Caltac Laboratories), 10µl anty-CD19 PerCP Cy 5.5 (Becton Dickinson), 20 µl anty-CD5 FITC (Becton Dickinson) i 10µl anty-CD2 PE (Becton Dickinson). Ponadto przygotowano kontrolę izotypową. W tym celu do drugiej próbki dodawano przeciwciała anty-CD19 PerCP Cy 5.5 (20 µl, Becton Dickinson), anty-CD2 PE (10µl, Becton Dickinson), anty-CD5 FITC (20 µl, Becton Dickinson) oraz IgG1 Alexa Fluor 488 (10 µl, Becton Dickinson). W kolejnym kroku do opisanych próbek dodawano po 100 µl materiału badanego zawierającego 1x10⁶ leukocytów. Całość ponownie delikatnie wytrząsano na mikrowstrząsarce ML-1 (vortex) przez ok. 3-5 sekund. Przygotowane mieszaniny inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w warunkach ciemni. Następnie, do próbek dodawano 100 µl płynu utrwalającego i ponownie inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym przemywano mieszaniną o składzie 3 ml PBS, 0,1% NaN₃, 5% FBS‡. Mieszaninę odwirowywano przez 5 minut, zlewano supernatant, po czym ponownie delikatnie wytrząsano na mikrowstrząsarce ML-1 (vortex). Następnie dodawano 100 µl płynu permabilizującego i 10 µl znakowanych przeciwciał wewnątrzkomórkowych anty human Mouse ZAP70 Alexa Fluor 488 (Caltac Laboratories) a

* PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej bez jonów Ca i Mg

† Badania przeprowadzono we współpracy z Pracownią Cytometrii Katedry i Kliniki Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego w Poznaniu (mgr Jolanta Kiernicka - Parulska, mgr Anna Błazejczak, dr med. Anna Czyż)

‡ Fetal Bovine Serum (FBS) – wołowa surowica płodowa

do próby kontrolnej 10 μ l IgG1 (Alexa Fluor 488, Becton Dickinson). Mieszaninę ponownie wytrząsano na mikrowstrząsarce ML-1 (vortex) przez 1-2 sekundy, po czym inkubowano przez 20 minut. Otrzymany materiał ponownie przemywano mieszaniną o składzie 3 ml PBS, 0,1% NaN_3 , 5% FBS. Próbkę odwirowywano przez 5 minut (wirówka MPW-360, 2500 obrotów/sekundę), a supernatant zlewano. W kolejnym kroku osad komórkowy zawieszano w płynie utrwalającym. I tak przygotowany materiał komórkowy poddawano ocenie w ośmiokanałowym cytometrze przepływowym Canto II (firmy Becton Dickinson).

III.3.3 Interpretacja uzyskanych wyników ekspresji antygenów metodą cytometrii przepływowej

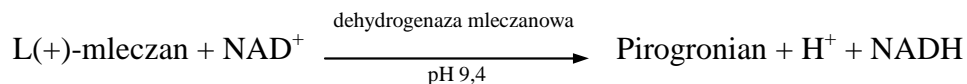
Zgodnie z danymi dostępnymi w literaturze w przypadku potwierdzenia obecności CD26 na więcej niż 10% komórek badanych próbkę uznawano za dodatnią (CD26^+) [60]. W przypadku obecności antygeny CD38, próbkę uznawano za dodatnią, jeśli wykazano jego ekspresję na powierzchni co najmniej 30% badanych komórek (CD38^+). W przypadku wykazania obecności ekspresji ZAP70 w co najmniej 20% komórek białaczkowych próbkę uznawano za dodatnią (ZAP70^+) [49].

III.3.4 Ocena aktywności dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy badanych pacjentów oznaczono w laboratorium Szpitala Klinicznego Nr 1 w Poznaniu w oparciu o system biochemiczny Dimension® oraz specyficzny substrat (L-mleczan, pH 9,4). Materiałem badanym była surowica lub osocze z dodatkiem heparyny sodowej i/lub litowej.

Podstawą wymienionej metody jest reakcja dehydrogenazy mleczanowej z substratem w obecności NAD^+ (dinukleotyd nikotynamidoadeninowy). W jej wyniku dochodzi do powstania pirogronianu i NADH. Pomiar szybkości przebiegu reakcji przy długości fali 340/700 nm umożliwia ocenę aktywności dehydrogenazy mleczanowej w ocenianej próbce. Schemat reakcji przedstawiono na poniższej rycinie.

Rycina 8. Przebieg reakcji utleniania L-mleczanu przez dehydrogenazę mleczanową w obecności NADH



III.3.5 Pomiar stężenia β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi

Stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy ocenianych pacjentów z B-CLL oznaczono za pomocą mikrocząsteczkowego testu immunoenzymatycznego AxSYM β_2 -Mikroglobulin (Microparticle Enzyme immunoassay – MEIA). Badania wykonano w Laboratorium Szpitala Klinicznego Nr 1 w Poznaniu na ulicy Łąkowej. Materiałem badanym była krew obwodowa pobrana na antykoagulant (heparynę lub EDTA). Po rozcieńczeniu materiału badanego (surowica lub osocze) próbkę poddawano inkubacji z mikrocząsteczkami pokrytymi przeciwciałami przeciwko β_2 -mikroglobulinie. Następnie do próbki dodawano roztwór 4 AxSYM. W wyniku inkubacji β_2 -mikroglobulina obecna w próbce wiązała się z przeciwciałem tworząc kompleksy przeciwciało – antygen. Po inkubacji mieszaninę reakcyjną przenoszono do celki matrycowej, w której mikrocząsteczki nieodwracalnie wiązały się z włóknem szklanym matrycy. W kolejnym kroku, celkę matrycową przemywano w celu usunięcia niezwiązanego materiału. Następnie, do celki matrycowej dodawano przeciwciało przeciwko β_2 -mikroglobulinie związane z fosfatazą alkaliczną. Celkę matrycową ponownie przemywano w celu usunięcia niezwiązanego materiału, a następnie dodawano do niej specyficznego substratu – fosforanu 4-metylumbeliferylu. Pomiaru stężenia β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi dokonywano za pomocą urządzenia optycznego MEIA mierzącego intensywność fluorescencji w próbce badanej.

III.3.6 Ocena obecności aberracji cytogenetycznych w komórkach B-CLL techniką FISH (*ang. fluorescent in situ hybridization*)

Materiałem do badań cytogenetycznych była krew obwodowa w ilości 4 ml pobrana z nakłucia żyły odłokciowej do probówek-strzykawek automatycznych firmy

Sarstedt zawierających antykoagulant (heparyna litowa). Po pobraniu materiał delikatnie mieszano, a następnie zakładano 48-godzinne hodowle komórkowe. W każdym przypadku wyprowadzano dwa rodzaje hodowli: stymulowaną TPA (TPA phorbol 12-myristate 13-acetate) i niestymulowaną. Procedurę hodowli przeprowadzano w warunkach sterylnych w komorze o przepływie laminarnym. Materiał komórkowy zawieszony w specjalnym medium w butelkach do hodowli umieszczano w inkubatorze (temperatura 37°C, atmosfera 5% dwutlenku węgla (CO₂)). W celu zatrzymania podziałów komórkowych w stadium metafazy 30 minut przed zaplanowanym zakończeniem hodowli do próbek dodawano N-diacetylo-N-metylokolchicyny (Colcemid®) w ilości 10µl na 1 ml medium. Następnie zawiesinę komórkową przelewano do odpowiednio opisanych probówek stożkowych o pojemności 15ml i poddawano wirowaniu przy prędkości 2000 obrotów/min (4°C, 10 minut). Uzyskany supernatant zlewano, a do osadu powoli dodawano 8 ml 0,075M roztworu KCl. W wyniku szoku osmotycznego zabieg ten prowadził do popękania błon komórkowych i wyodrębnienia jąder komórkowych. W kolejnym kroku, uzyskany materiał inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut, a następnie odwirowano przy prędkości 2000 obrotów/min w temperaturze 4°C. Supernatant ponownie zlewano, dodawano 4 ml roztworu Carnoy'a (metanol i kwas octowy w stosunku 3:1) i odwirowano. Procedura ta pozwalała na utrwalenie uzyskanych preparatów komórkowych. Następnie, za pomocą pipety automatycznej na szkiełko podstawowe nakładano 30µl tak przygotowanego materiału, preparat płukano w roztworze 2xSSC* przez 10 minut w temperaturze 37°C. Proces odwadniania preparatu przeprowadzano poprzez dwuminutowe płukanie w etanolu o coraz wyższym stężeniu (70%, 85% i 96%). Na tak przygotowane preparaty nakładano 5 µl sondy w buforze do hybrydyzacji, a następnie przykrywano szkiełkiem nakrywkowym, pokrytym klejem typu Fixoguma. W celu hybrydyzacji sond preparat umieszczano na czas 4,5 do 5 minut na płycie grzejnej o temperaturze 71°C. Po zakończeniu hybrydyzacji badaną próbkę przenoszono do wilgotnej komory o temperaturze 37°C. Po 20 godzinach szkiełko nakrywkowe odklejano, a preparat płukano buforem I (0,4 x SSC + 0,3% Tween) przez 2 minuty w temperaturze 73°C, a następnie w buforem II (2 x SSC + 0,1% Tween) przez 1 minutę w temperaturze 37°C celem usunięcia niezwiązanej wody. W końcowym etapie na próbkę nakładano 10 µl niebieskiego barwnika DAPI, absorbowanego przez nieuszkodzone jądra komórkowe. Powyższą procedurę realizowano w przypadkach wykrywania obecności delecji 13q14.3, 13q34, 11q22-23, 17p13

* SSC – dwuwodny cytrynian sodu (NaCl + Na₃C₆H₅O₇ x 2 H₂O)

oraz trisomii chromosomu pary 12. Do wymienionych oznaczeń stosowano sondy LSI p53/LSI ATM oraz LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12.*

III.4 Analiza statystyczna

W celu analizy danych zastosowano szereg metod statystycznych. W początkowej fazie analizy dla wszystkich parametrów ilościowych obliczono następujące statystyki opisowe: średnią arytmetyczną, medianę, minimum, maximum, dolny kwartył, górny kwartył, odchylenie standardowe i błąd standardowy, natomiast parametry jakościowe scharakteryzowano poprzez przedstawienie liczebności procentowych. Kolejny etap obejmował analizę istotności różnic pomiędzy porównywanymi grupami. Dla wszystkich parametrów ilościowych sprawdzono ich zgodność z rozkładem normalnym. Ocena zgodności przeprowadzono testem Shapiro-Wilka. Jako krytyczny poziom istotności przyjęto $p=0,05$. Istotność różnic wartości średnich w dwóch grupach dla parametrów o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach sprawdzono testem t-Studenta. Jednorodność wariancji sprawdzono testem Bartlett'a. Istotność różnic wartości średnich w dwóch grupach, dla parametrów o rozkładzie różnym od normalnego lub o niejednorodnych wariancjach, sprawdzono nieparametrycznym testem U Manna-Whitney'a. Istotność różnic wartości średnich w trzech grupach zaawansowania klinicznego według Rai dla parametrów o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach sprawdzono analizą wariancji. Dla zweryfikowania różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano test Tukey'a. Istotność różnic wartości średnich w trzech grupach zaawansowania klinicznego według Rai dla parametrów o rozkładzie różnym od normalnego lub niejednorodnych wariancjach sprawdzono testem nieparametrycznym Kruskala-Wallis'a. Dla zweryfikowania różnic pomiędzy wartościami średnimi zastosowano post-hoc wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich prób.

Dla par parametrów o rozkładach normalnych obliczono współczynnik korelacji Pearson'a, dla par parametrów o rozkładzie różnym od normalnego (przynajmniej jeden z parametrów miał rozkład różny od normalnego) obliczono współczynnik korelacji Spearman'a - r.

* Badania przeprowadzono we współpracy z Pracownią Cytogenetyki Katedry i Kliniki Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego w Poznaniu (mgr Joanna Czerwińska, mgr Anna Przybyłowicz-Chalecka, mgr Błażej Ratajczak, dr med. Małgorzata Jarmuż, dr med. Renata Kroll-Balcerzak).

W celu oceny prawdopodobieństwa przeżycia zastosowano metodę Kaplana - Meiera. W celu określenia różnic pomiędzy przeżyciem całkowitym grup badanych chorych zastosowano test log-rank.

Do oceny różnicowania natężeń cech pomiędzy badanymi parami parametrów wykorzystano test χ^2 lub test χ^2 z poprawką Yates'a. Dla wybranych sześciu zmiennych wykonano analizę skupień. Służy ona do wyodrębnienia homogenicznych grup pośród obiektów pochodzących z populacji heterogenicznej. Wykonuje się to poprzez poszukiwanie grup (skupień) obiektów, które są bardziej podobne do obiektów współtworzących dane skupienie niż do obiektów innych skupień. Grupy te są wyodrębnione z danych empirycznych bez jakichkolwiek wcześniejszych schematów klasyfikacyjnych. Wykorzystano technikę k-średnich, w której do określenia liczby skupień użyto diagramu drzewa decyzyjnego. Obiekty przydzielone do skupień znajdują się w najbliższej odległości w stosunku do swoich środków ciężkości.

Dla oznaczenia poziomu istotności stwierdzonych związków lub różnic (wartości p) zastosowano następujące oznaczenia: ns – $p \geq 0,05$ – wartość nieistotna statystycznie, * – $p < 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ wartość istotna statystycznie.

We wszystkich obliczeniach wykorzystano pakiet statyczny STATISTICA 9.1.

IV WYNIKI BADAŃ

IV.1 Wyniki oznaczeń laboratoryjnych

IV.1.1 Morfologia krwi, ocena morfologiczna komórek rozmazu krwi obwodowej oraz szpiku kostnego

W chwili rozpoznania choroby średnia liczba leukocytów we krwi obwodowej u osób z grupy badanej wyniosła 47,31 G/l, a średnia liczba limfocytów 35,7 G/l. W ocenie cytologicznej odsetek limfocytów we krwi obwodowej w chwili rozpoznania choroby wyniósł średnio 77,26%, a w badaniu cytometrycznym (limfocyty B-CLL CD19⁺/CD5⁺) 73,56% ogółu komórek jądrzastych krwi obwodowej. Średnia liczba granulocytów (4,45 G/l) we krwi obwodowej mieściła się w granicach normy, odsetek granulocytów obojętnochłonnych w ocenie cytologicznej rozmazu krwi obwodowej wyniósł średnio 18,28%. W momencie rozpoznania choroby także średnie stężenie hemoglobiny i liczba płytek krwi były prawidłowe i wyniosły odpowiednio 8,2 mmol/l i 196,85 G/l. W chwili rozpoznania choroby średnia limfocytoza szpiku kostnego w ocenie morfologicznej wyniosła 71,8%, a w ocenie immunofenotypowej limfocyty B-CLL CD19⁺/CD5⁺ stanowiły średnio 76,4% komórek jądrzastych szpiku kostnego. Wartości średnie i mediany dla przedstawionych danych zestawiono w tabeli (Tabela 7, str. 37).

IV.1.2 Ocena odsetka komórek wykazujących ekspresję określonych antygenów na komórkach B-CLL metodą cytofluorometrii przepływowej

W poniższej tabeli zestawiono odsetki limfocytów białaczkowych pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową, na których wykazano ekspresję antygenów CD26, CD38 oraz ZAP70.

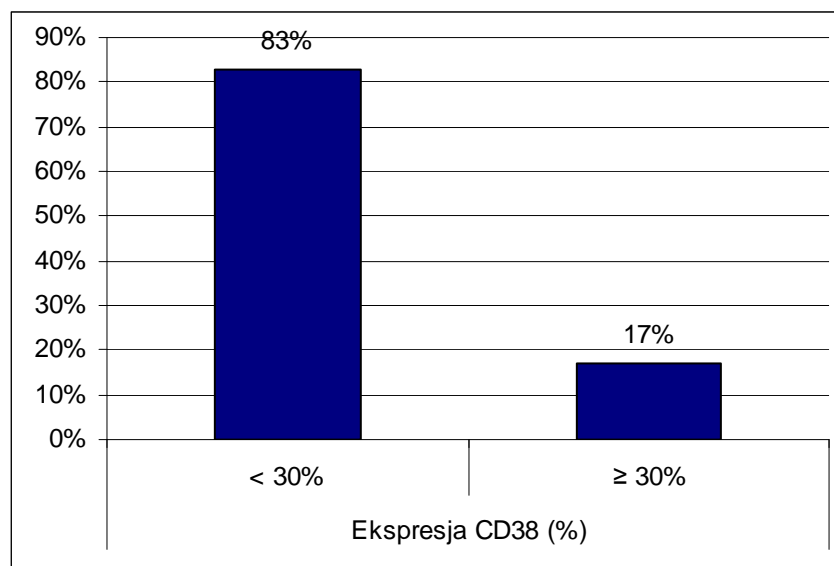
Tabela 8. Charakterystyka badanej grupy chorych z B-CLL w chwili rozpoznania choroby.
Inne dane laboratoryjne

Parametr	Liczebność grupy badanej	$\bar{x} \pm SD$ (min ; max)	Me \pm SE (Q1 ; Q3)
Ekspresja CD26 (%) na komórkach białaczkowych	94	10,93 \pm 17,582 (0 ; 90,7)	1,3 \pm 1,814 (0,1 ; 14,5)
Ekspresja CD38 (%) na komórkach białaczkowych	146	16,21 \pm 25,312 (0 ; 100)	3,6 \pm 2,095 (0,5 ; 21,2)
Ekspresja ZAP70 (%) na komórkach białaczkowych	101	39,26 \pm 27,939 (0 ; 97)	33 \pm 2,78 (16,6 ; 59)
Aktywność LDH (U/l) w surowicy krwi	150	266,62 \pm 169,797 (107 ; 1339)	208 \pm 13,864 (165 ; 300)
Stężenie β_2-mikroglobuliny (μg/l) w surowicy krwi	111	2508,74 \pm 1312,349 (1034,3 ; 8108,8)	2189,2 \pm 124,563 (1521,2 ; 3264,9)

IV.1.2.1 CD38

Ocenę ekspresji CD38 na komórkach CD5⁺CD19⁺CD23⁺ przeprowadzono u 146 chorych. Jego obecność potwierdzono średnio na 16,21% komórek poddanych ocenie (mediana 3,6%) (Tabela 8, str. 46). Obecność antygenu CD38 na co najmniej 30% badanych komórek wykazano u 17% ocenionych chorych. U pozostałej części pacjentów (83%) antygen CD38 był obecny na < niż 30% badanych komórek B-CLL (Rycina 9).

Rycina 9. Odsetek komórek białaczkowych $CD5^+CD19^+CD23^+$ wykazujących ekspresję antygeny CD38 na swojej powierzchni w ocenie cytofluorymetrycznej (analiza w ośmiokolorowym cytometrze przepływowym firmy Becton-Dickinson Canto II)



Poniżej przedstawiono przykładowe obrazy uzyskane w trakcie oceny ekspresji antygeny CD38 metodą cytofluorymetrii przepływową (ośmiokolorowy cytometr Canto II) na limfocytach krwi obwodowej pozyskanych od pacjenta z B-CLL.

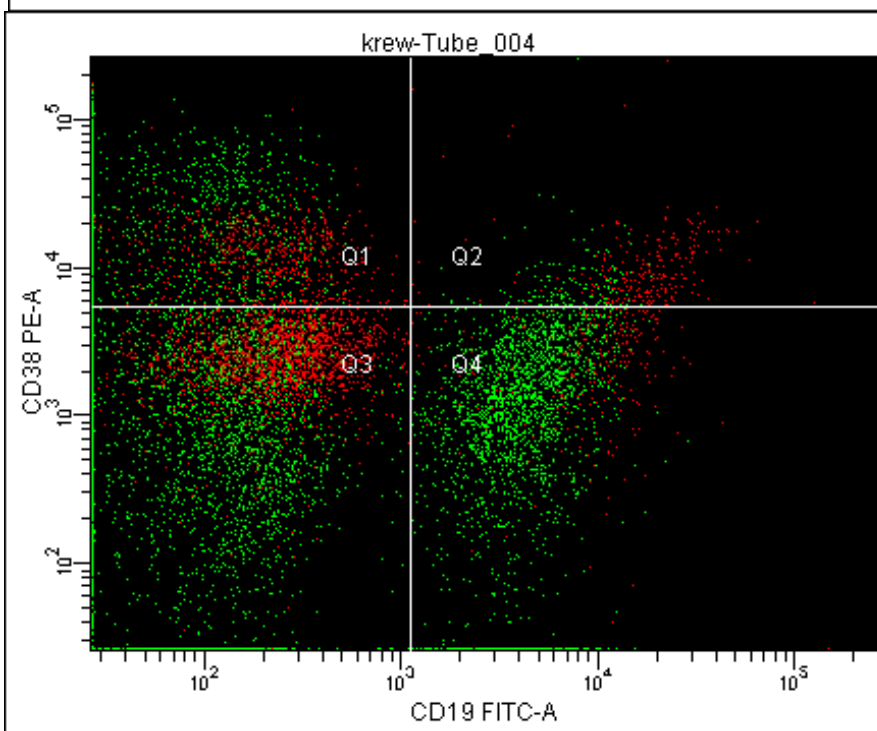
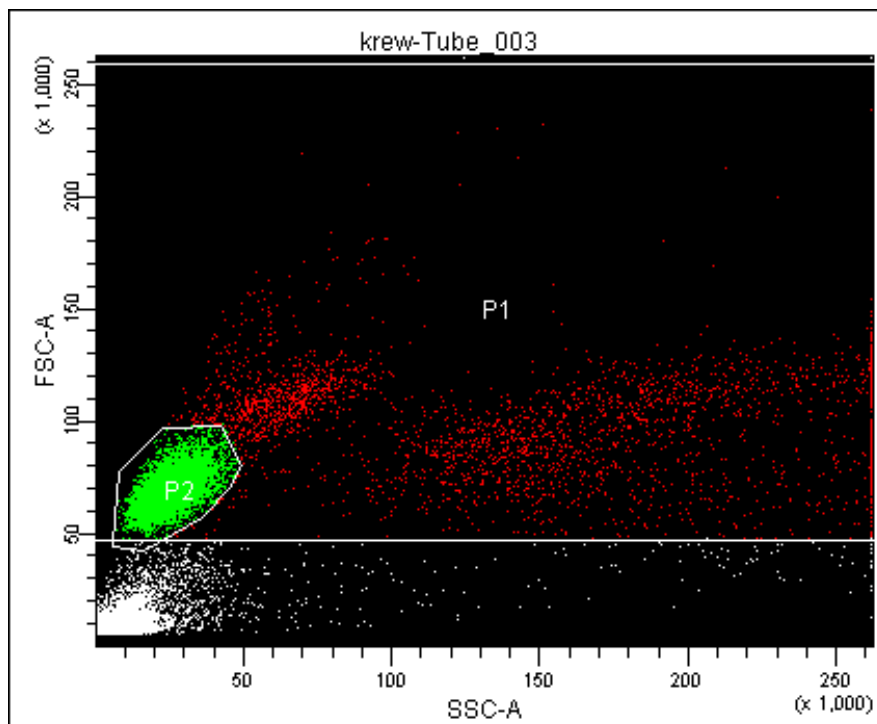
Rycina 10. Ocena obecności antygeny CD38 metodą cytofluorymetrii przepływową na limfocytach $CD19^+$ krwi obwodowej w przypadku przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej.

Objaśnienia:

Rycina górna: obszar P1 – komórki jądrowe krwi obwodowej (zaznaczone na czerwono); obszar P2 – populacja limfocytów krwi obwodowej poddana ocenie (zaznaczone na zielono)

Rycina środkowa: Q1 – $CD19^-/CD38^+$, Q2 – $CD19^+/CD38^+$, Q3 – $CD19^-/CD38^-$, Q4 – $CD19^+/CD38^-$

Rycina dolna: tabela wyników - Q2 – $CD19^+/CD38^+$ (2,6%).



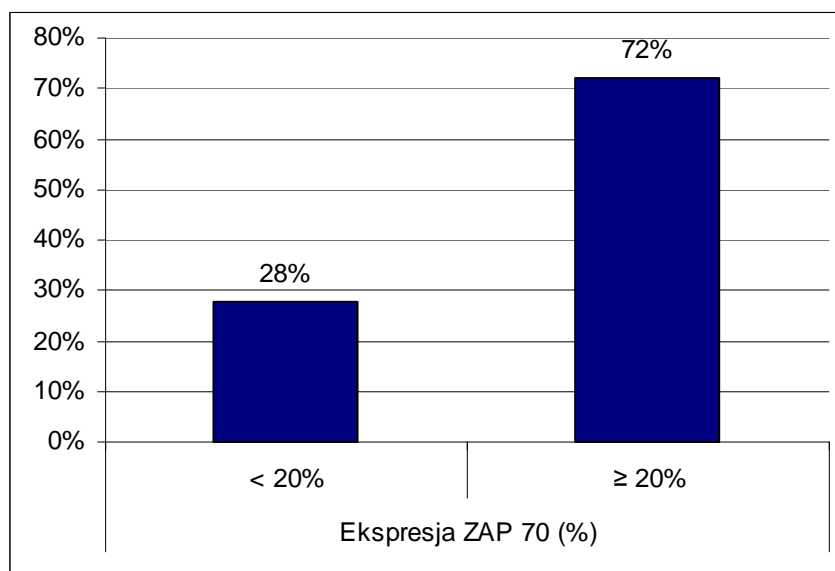
Tube: Tube_004

Population	Wynik:	#Events	%Parent	%Total
<input type="checkbox"/> All Events	CD19 ⁺ /CD38 ⁺ 2,6%	43,928	####	100.0
<input checked="" type="checkbox"/> P1		10,021	22.8	22.8
<input checked="" type="checkbox"/> P2		6,782	67.7	15.4
<input checked="" type="checkbox"/> Q1		1,432	21.1	3.3
<input checked="" type="checkbox"/> Q2		176	2.6	0.4
<input checked="" type="checkbox"/> Q3		3,183	46.9	7.2
<input checked="" type="checkbox"/> Q4		1,991	29.4	4.5

IV.1.2.2 ZAP70

Cytoplazmatyczną ekspresję ZAP70 (%) w limfocytach białaczkowych określono u 101 chorych. Ekspresję ZAP70 wykazano średnio na 39,26% badanych limfocytów CD5⁺CD19⁺CD23⁺ (mediana 33%) (Tabela 8, str. 46). Ekspresję ZAP70 na co najmniej 20% ocenianych komórek potwierdzono u 72% badanych pacjentów. U pozostałych 28% chorych ekspresję ZAP70 wykazano na mniej niż 20% komórek białaczkowych (Rycina 11).

Rycina 11. Odsetek komórek białaczkowych CD5⁺CD19⁺CD23⁺ wykazujących i nie wykazujących ekspresji ZAP70 w ocenie cytofluorometrycznej



Poniżej przedstawiono przykładowe obrazy uzyskane w trakcie oceny metodą cytofluorometrii przepływowej (ośmiokolorowy cytofluorometr Canto II) ekspresji ZAP70 w limfocytach krwi obwodowej chorych z B-CLL.

Rycina 12. Błonowo-cytoplazmatyczna ekspresja ZAP-70 w komórkach B-CLL krwi obwodowej oceniana metodą fluorocytometrii przepływowej (aparat Canto II, Becton-Dickinson)

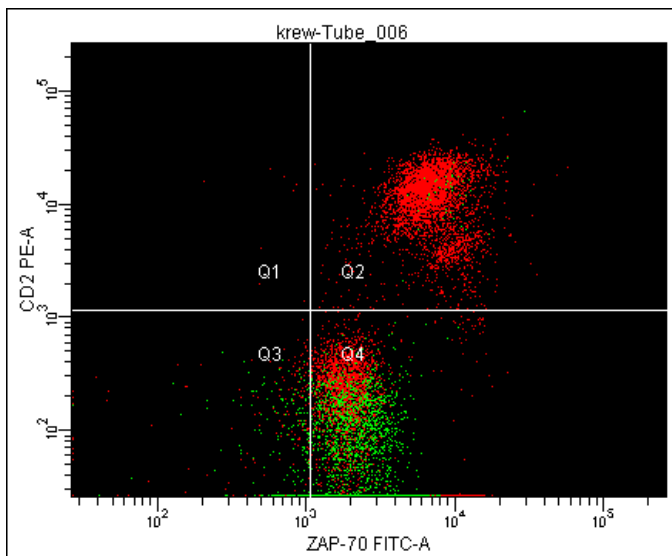
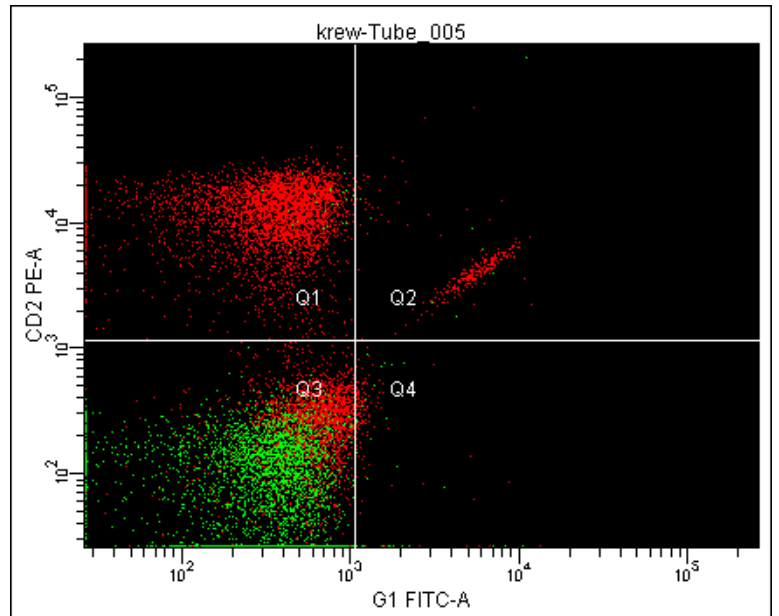
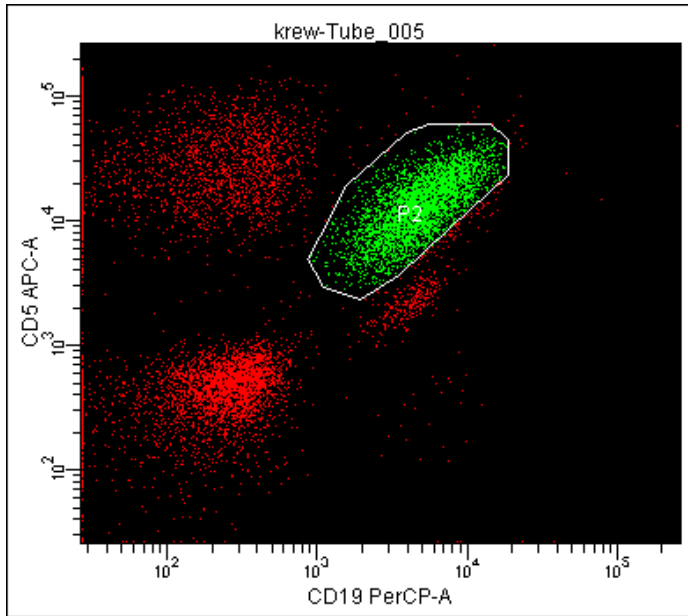
Objaśnienia:

rycina górna lewa: obszar P2 - limfocyty $CD5^+CD19^+$ (zaznaczone na zielono),

rycina górna prawa: kontrola z przeciwciałem anti-CD2 (IgG1) w celu odcięcia komórek pozytywnych i negatywnych,

rycina dolna lewa: Q4 – komórki $CD5^+CD19^+$ z ekspresją ZAP70

rycina dolna prawa: tabela wyników - Q4 – $CD5^+CD19^+$ (92,5%)



Tube: Tube_006

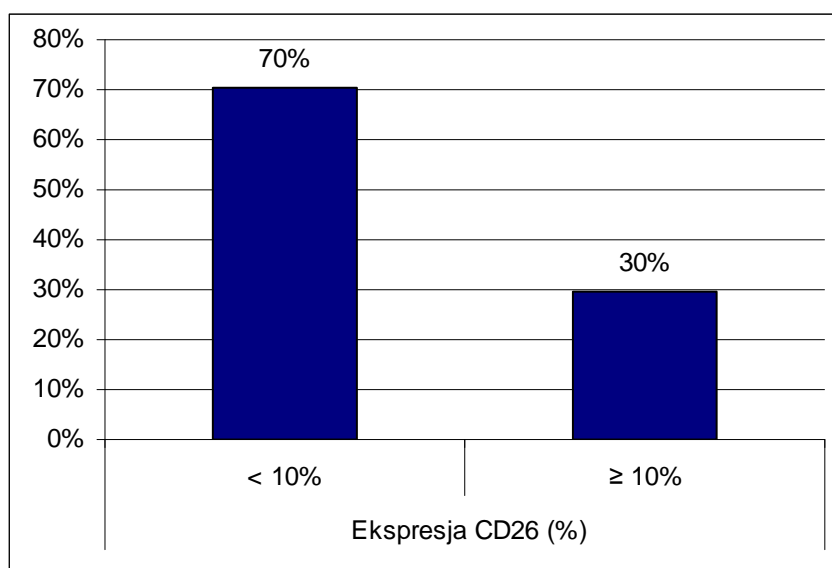
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	13,994	####	100.0
P1	10,060	71.9	71.9
P2	3,520	35.0	25.2
Q1	0	0.0	0.0
Q2	43	1.2	0.3
Q3	220	6.2	1.6
Q4	3,257	92.5	23.3

Wynik:
ZAP70 - 92,5%

IV.1.2.3 Dipeptydylopeptydaza IV/CD26

Ekspresję antygenu CD26 na komórkach białaczkowych oceniono u 94 badanych pacjentów. Wartość średnia komórek z ekspresją CD26 wyniosła 10,93%, a jej mediana 1,25%. (Tabela 8, str. 46). Ekspresję antygenu CD26 na < 10% limfocytów CD5⁺CD19⁺CD23⁺ wykazano u 70% badanych (n=66). U pozostałych 30% badanych chorych (n=28) ekspresja CD26 dotyczyła ≥ niż 10% ocenianych komórek (Rycina 13). U 18 pacjentów nie stwierdzono komórek wykazujących ekspresję CD26. U 14 z nich rozpoznano 0 lub I stopień zaawansowania klinicznego według Rai.

Rycina 13. Odsetek komórek białaczkowych CD5⁺CD19⁺CD23⁺ wykazujących ekspresję CD26 w ocenie cytofluorymetrycznej (analiza w ośmiokolorowym cytofluorymetrze przepływowym Canto II, Becton-Dickinson)



Przykładowe obrazy uzyskane w trakcie oceny metodą cytofluorymetrii przepływową (ośmiokolorowy aparat Canto II) limfocytów krwi obwodowej z obecnością ekspresji CD26 u pacjenta z B-CLL przedstawiono na Rycinie 14.

Rycina 14. Ocena ekspresji CD26 w komórkach B-CLL krwi obwodowej w cytofluorymetrze ośmiokolorowym Canto II

Przypadek przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej.

Objaśnienia:

rycina górna lewa: obszar P1- komórki jądrzaste krwi obwodowej (zaznaczone na czerwono), obszar P2 - populacja limfocytów krwi obwodowej poddana ocenie (zaznaczone na niebiesko) – 74,3%,

rycina górna prawa: obszar P3 - limfocyty CD5⁺19⁺ (zaznaczone na niebiesko) – 45%,

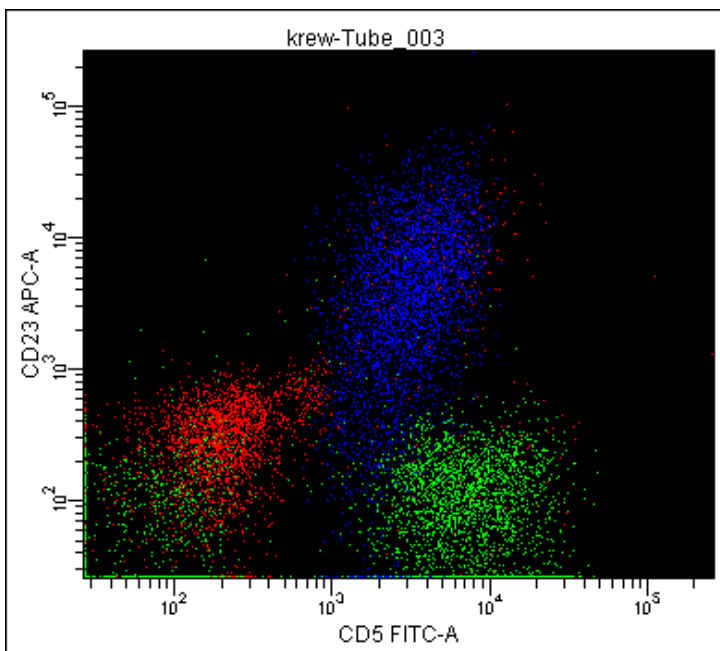
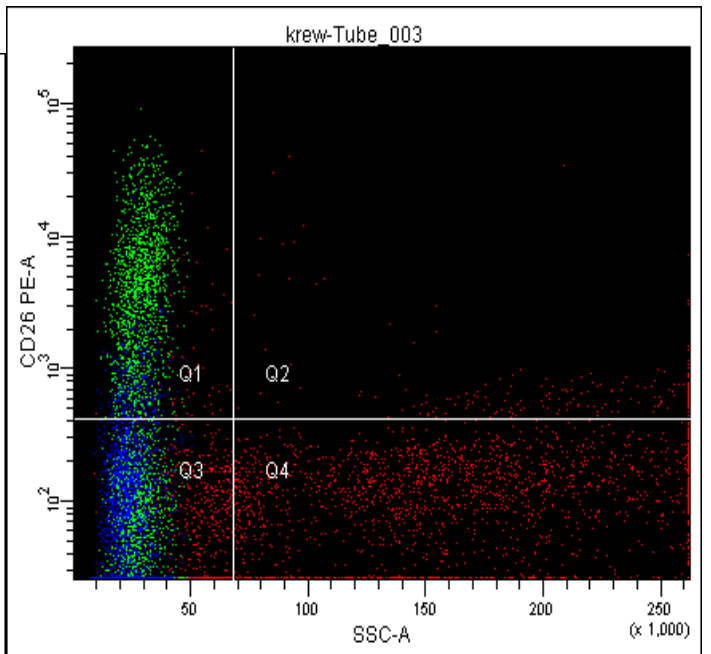
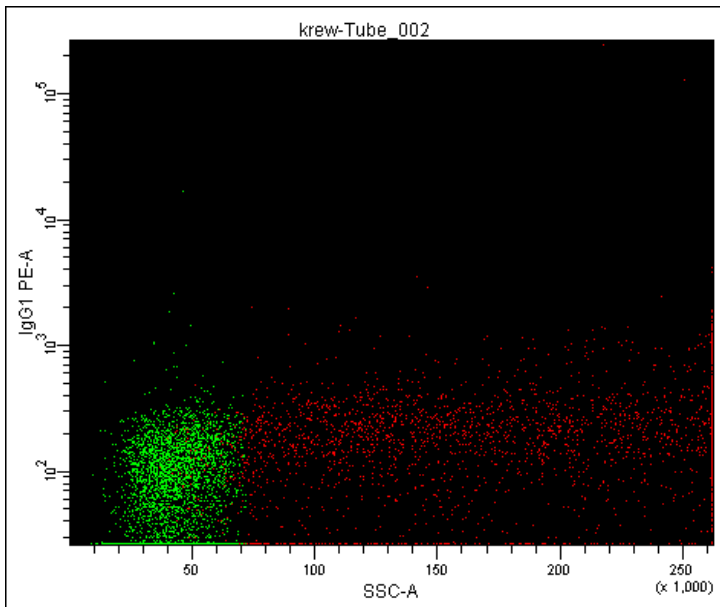
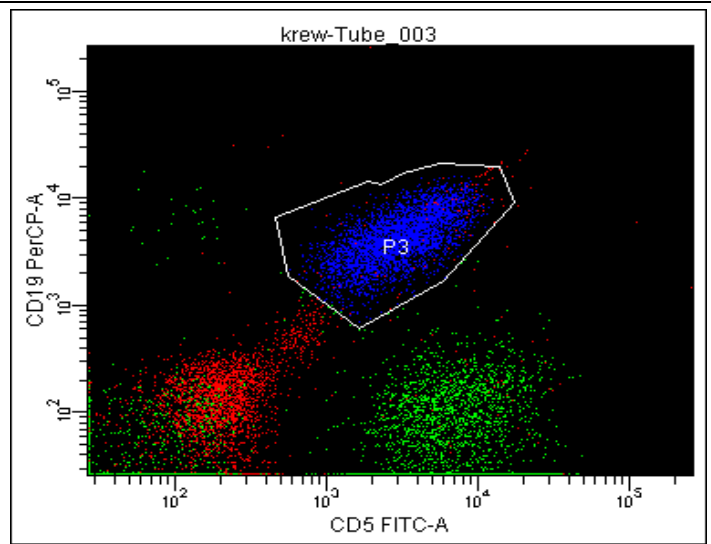
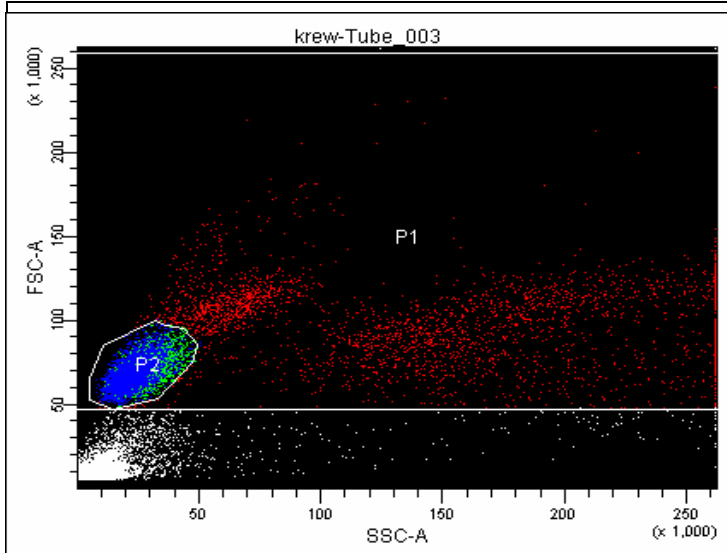
rycina środkowa lewa: kontrola z przeciwciałem anti-CD2 (IgG1) w celu odcięcia komórek pozytywnych i negatywnych,

rycina środkowa prawa: Q1 – komórki CD5⁺CD19⁺CD23⁺ z ekspresją CD26 – 8,2%

rycina dolna lewa - potwierdzenie z regionu P3 (CD19⁺CD5⁺) - widać koekspresję CD23 (limfocyty CD5⁺CD23⁺ zaznaczone na niebiesko)

rycina dolna prawa – tabela wyników

WYNIKI BADAŃ



Wynik:
CD5⁺/CD19⁺/CD23⁺/CD26⁺ - 8,2% (Q1)

Wynik:
limfocyty 74,3% (P2)

Wynik:
CD5⁺/CD19⁺ 45,1% (P3)

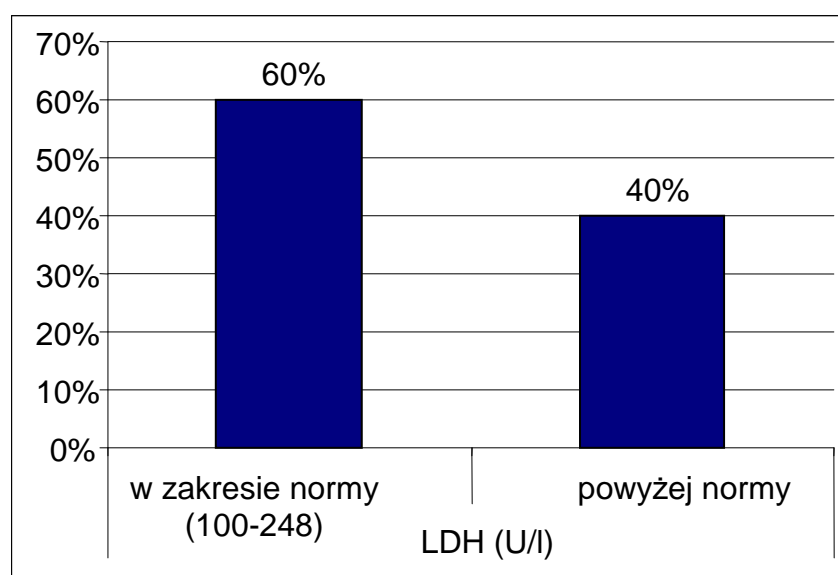
Tube: Tube_003

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	23,502	###	100.0
P1	10,031	44.6	44.6
P2	7,449	74.3	33.1
P3	3,361	45.1	14.9
Q1	276	8.2	1.2
Q2	0	0.0	0.0
Q3	3,085	91.8	13.7
Q4	0	0.0	0.0

IV.1.3 Ocena aktywności dehydrogenazy kwasu mlekowego w surowicy krwi

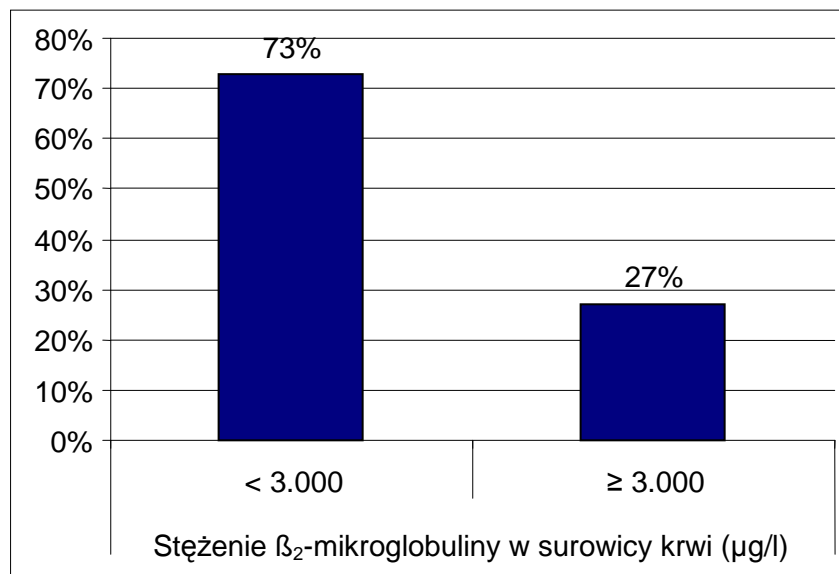
Wartość średnia aktywności LDH w surowicy krwi pacjentów z B-CLL poddanych ocenie wyniosła 266,62 U/l, a jej mediana 208 U/l (Tabela 8, str. 46). Aktywność LDH mieściła się w granicach normy u 60% badanych chorych. U 40% ocenianych pacjentów aktywność LDH przekraczała zakres wartości prawidłowej (>248 U/l). (Rycina 15).

Rycina 15. Aktywność LDH w surowicy krwi ocenianych chorych z B-CLL



IV.1.4 Ocena stężenia β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi

Stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy oznaczono u 111 badanych pacjentów. Średnie stężenie β_2 -mikroglobuliny wyniosło 2508,74 $\mu\text{g/l}$, natomiast jego mediana 2189,2 $\mu\text{g/l}$ (Tabela 8, str. 46). U 73% badanych chorych stężenie β_2 -mikroglobuliny we krwi było niższe niż 3000 $\mu\text{g/l}$. U pozostałych 27% badanych pacjentów stężenie β_2 -mikroglobuliny przekraczało wartość 3000 $\mu\text{g/l}$ (Rycina 16).

Rycina 16. Stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi badanych chorych z B-CLL

IV.1.5 Ocena obecności aberracji cytogenetycznych w komórkach B-CLL

Ocenę obecności wybranych aberracji cytogenetycznych w komórkach B-CLL przeprowadzono u 68 (42%) z 162 analizowanych chorych. Badania przeprowadzono stosując metodę FISH (*ang. fluorescent in situ hybridization*) i ocenę jąder interfazowych komórek krwi obwodowej.

Ocenę obecności delecji locus 13q14.3 (D13S319) przeprowadzono u 48 badanych pacjentów. Korzystny profil delecji (obecność delecji locus 13q14.3 (D13S319) w $\geq 10\%$ analizowanych metafaz) wykazano u 63% badanych chorych. U 37% pacjentów delecja w obrębie locus D13S319 (13q14.3) obecna była w $<$ niż 10% analizowanych metafaz (Rycina 17).

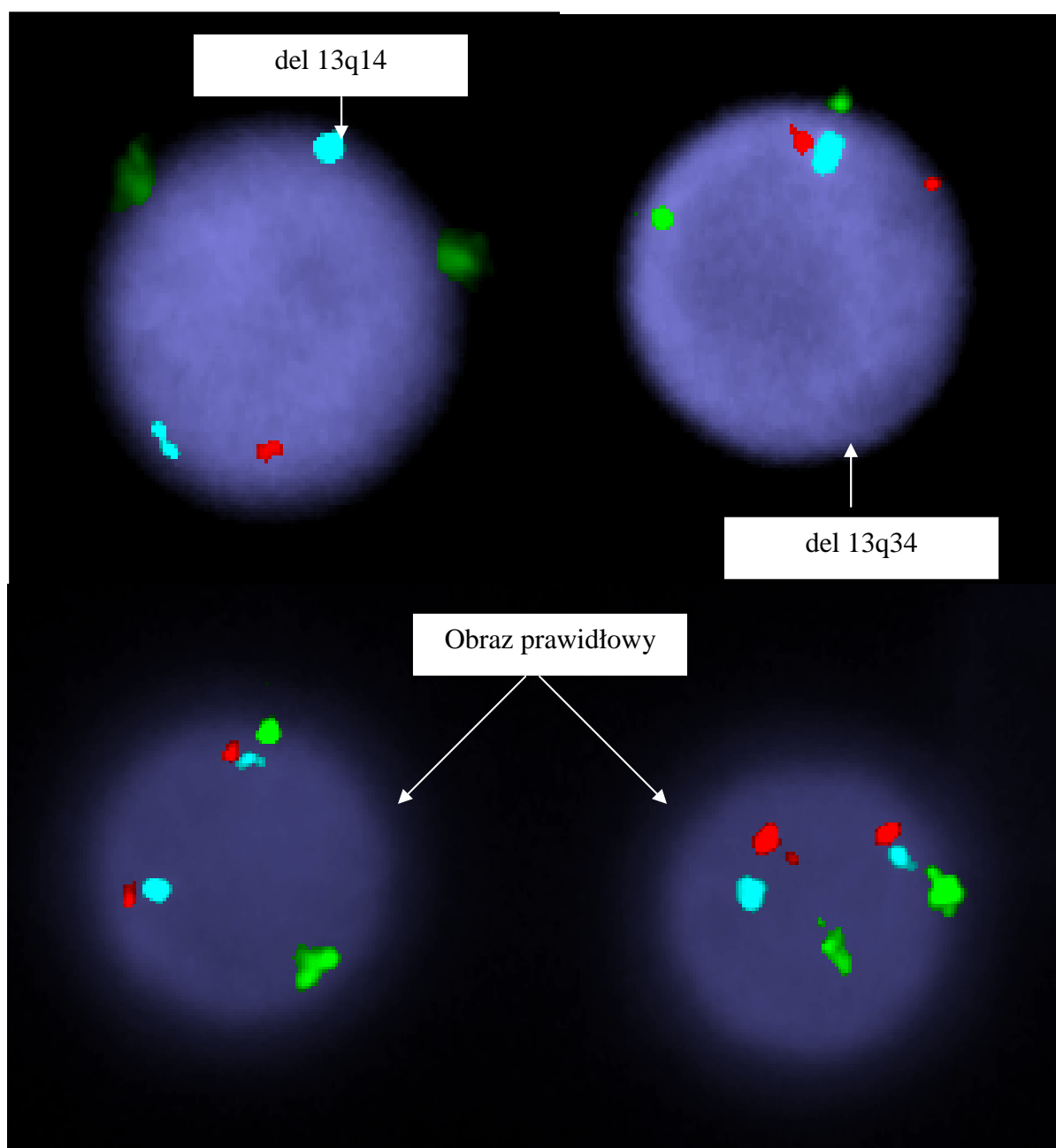
Rycina 17. Badanie w kierunku obecności delecji locus 13q14 i 13q34 (D13S319) w jądrach interfazowych komórek B-CLL. Ocena techniką FISH z zastosowaniem trykolorowej sondy delecyjnej 13q14-34, CEP12.

Interpretacja:

Rycina górna lewa: delecja locus 13q14 – widoczny jedynie jeden sygnał czerwony (13q14), dwa sygnały zielone (CEP12), dwa sygnały niebieskie (13q34).

Rycina górna prawa: delecja locus 13q34 – widoczne dwa sygnały czerwone (13q14), dwa sygnały zielone (CEP12), jedynie jeden sygnał niebieski (13q34).

Rycina dolna prawa i lewa: obraz prawidłowy – widoczne dwa sygnały czerwone (13q14), dwa sygnały zielone (CEP12), dwa sygnały niebieskie (13q34).



Ocenę obecności delecji w obrębie genu ATM (locus 11q22-23) przeprowadzono u 59 z badanych osób. Korzystny profil delecji (obecność delecji w obrębie ATM (locus 11q22-23) w < niż 10% analizowanych metafaz) wykazano u 47 (79,6%) badanych chorych. U 12 (20,4%) ocenianych pacjentów obecność delecji w obrębie genu ATM (11q22-23) potwierdzono w \geq 10% analizowanych metafaz. Przykładowe obrazy prawidłowe (nieobecność aberracji) oraz z obecnością delecji (del11q22-23) w komórkach B-CLL przedstawiono na Rycinie 18.

Badanie w kierunku obecności delecji 17p13 (p53) wykonano u 66 pacjentów. Korzystny profil delecji [tzn. obecność delecji locus 17p13 (gen p53) w < 10% analizowanych metafaz] wykazano u 50 (75,7%) badanych chorych. Obecność delecji locus 17p13 (w obrębie genu p53) \geq niż 10% analizowanych metafaz potwierdzono u 16 (24,3%) ocenianych pacjentów.

Poniżej przedstawiono wynik badania w kierunku obecności delecji locus 11q22-23 (gen ATM) oraz 17p13 (gen p53) w jądrach interfazowych komórek B-CLL. Analizę przeprowadzono techniką FISH z zastosowaniem dwukolorowych sond delecyjnych.

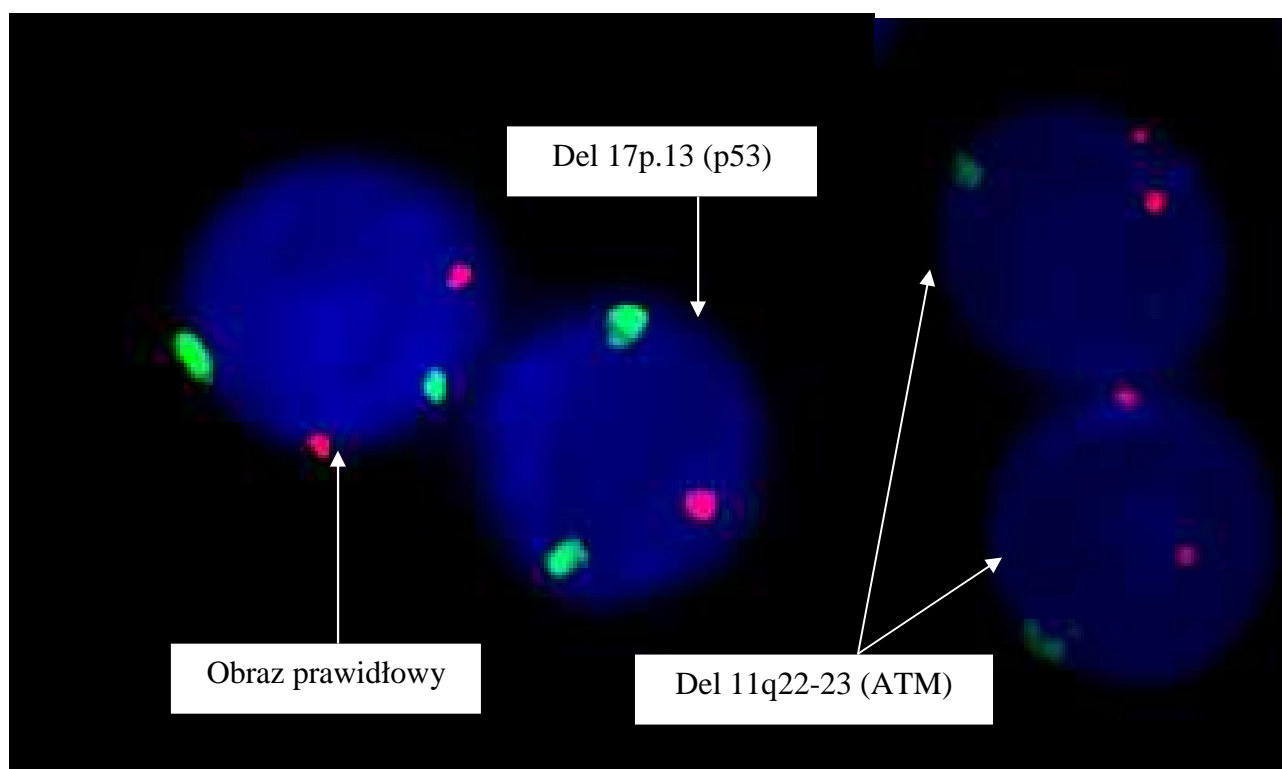
Rycina 18. Badanie w kierunku obecności delecji 11q22-23 (gen ATM) oraz delecji 17p.13 (gen p53). Analiza techniką FISH z zastosowaniem sond delecyjnych ATM oraz p53.

Interpretacja:

Delecja locus 11q22-23 (gen ATM) – widoczne dwa sygnały czerwone (p53) i jedynie jeden sygnał zielony (ATM)

Delecja locus 17p13 (gen p53) – widoczny jedynie jeden sygnał czerwony (p53) i dwa sygnały zielone (ATM)

Obraz prawidłowy – widoczne dwa sygnały czerwone (p53) i dwa sygnały zielone (ATM)

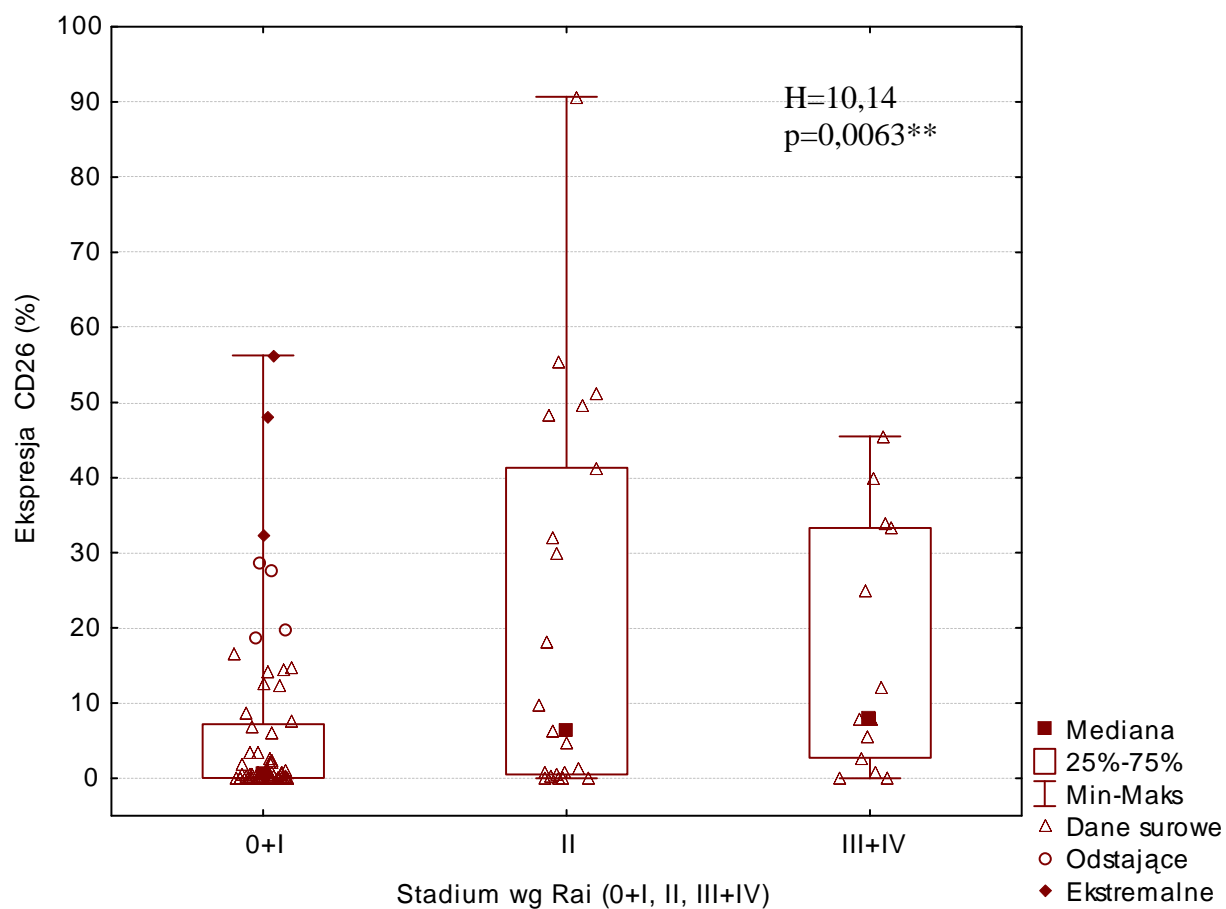


IV.2 Ekspresja dipeptydylopeptydazy IV (CD26) na komórkach białaczkowych a inne uznane czynniki rokownicze u pacjentów z B-CLL

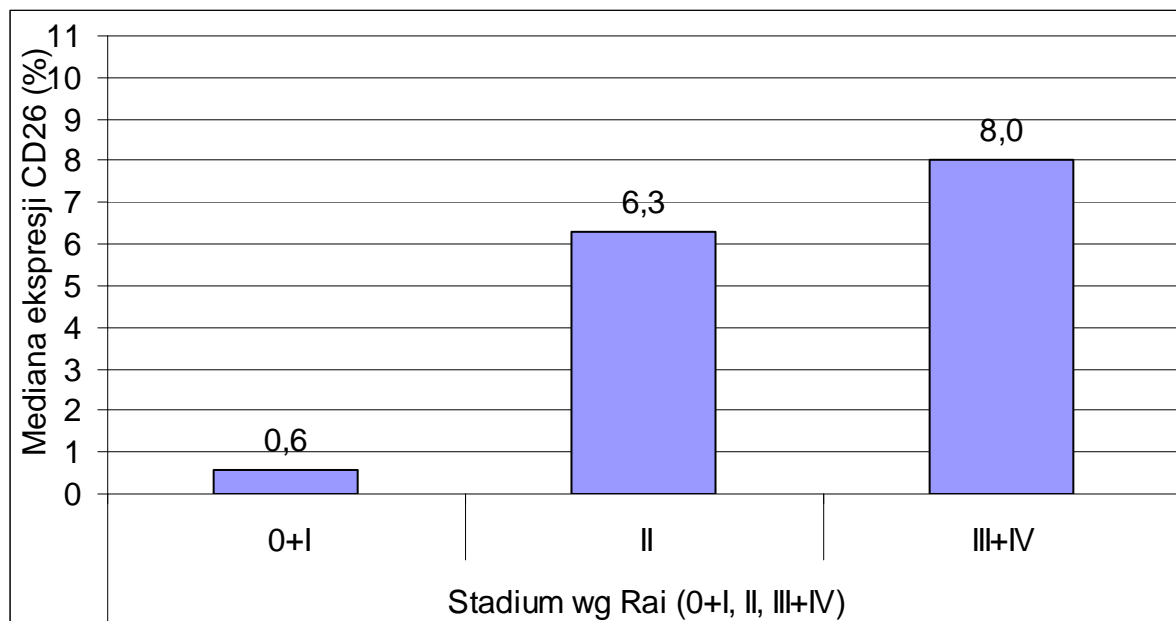
IV.2.1 Ekspresja CD26 na powierzchni komórek B-CLL (CD5⁺CD19⁺CD23⁺) a kliniczny okres zaawansowania choroby wg klasyfikacji Rai

Ocena wykazała, że odsetek komórek białaczkowych we krwi z obecnością ekspresji antygenu CD26 na swojej powierzchni rośnie wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego według klasyfikacji Rai ($p = 0,0063^{**}$) (Rycina 19). I tak, u chorych z 0-I okresem zaawansowania klinicznego mediana wyniosła 0,60%, z II – 6,3%, a z III-IV – 8,0% (Rycina 20). Potwierdzeniem tej obserwacji jest wykazanie obecności istotnych różnic w ekspresji CD26 w grupach ze stopniem zaawansowania klinicznego według Rai 0-I vs II ($p=0,0423^*$) oraz 0-I vs III+IV ($p=0,0383^*$). Znaczenie tej obserwacji osłabia fakt, że liczności poszczególnych grup różniły się znacznie między sobą (Tabela 13, str. 105).

Rycina 19. Związek ekspresji CD26 (%) na limfocytach białaczkowych z okresem zaawansowania klinicznego B-CLL według klasyfikacji Rai (0+I, II, III+IV)



Rycina 20. Mediana ekspresji CD26 (%) na limfocytach białaczkowych w zależności od okresu zaawansowania klinicznego B-CLL według klasyfikacji Rai (0+I, II, III+IV)

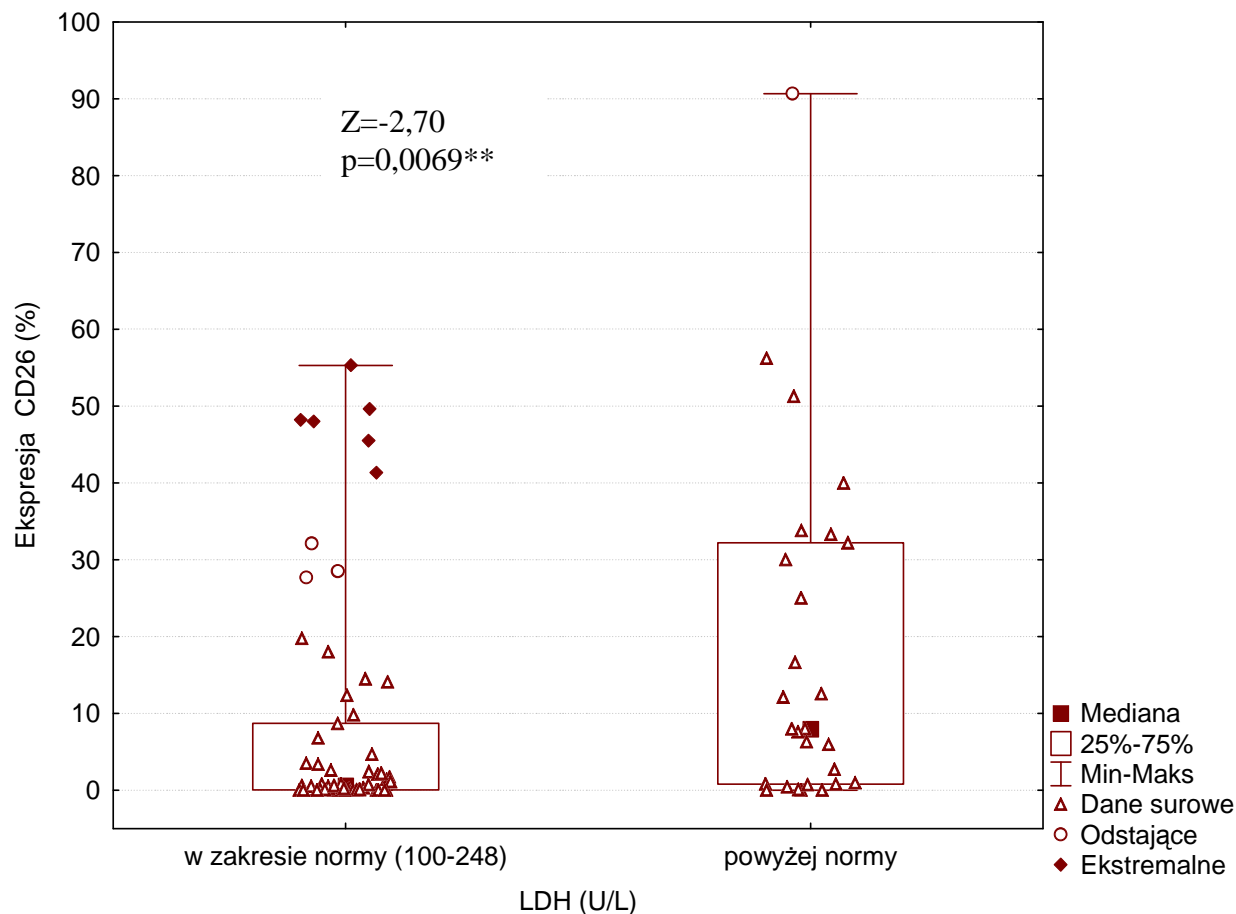


IV.2.2 Ekspresja CD26 na powierzchni komórek B-CLL

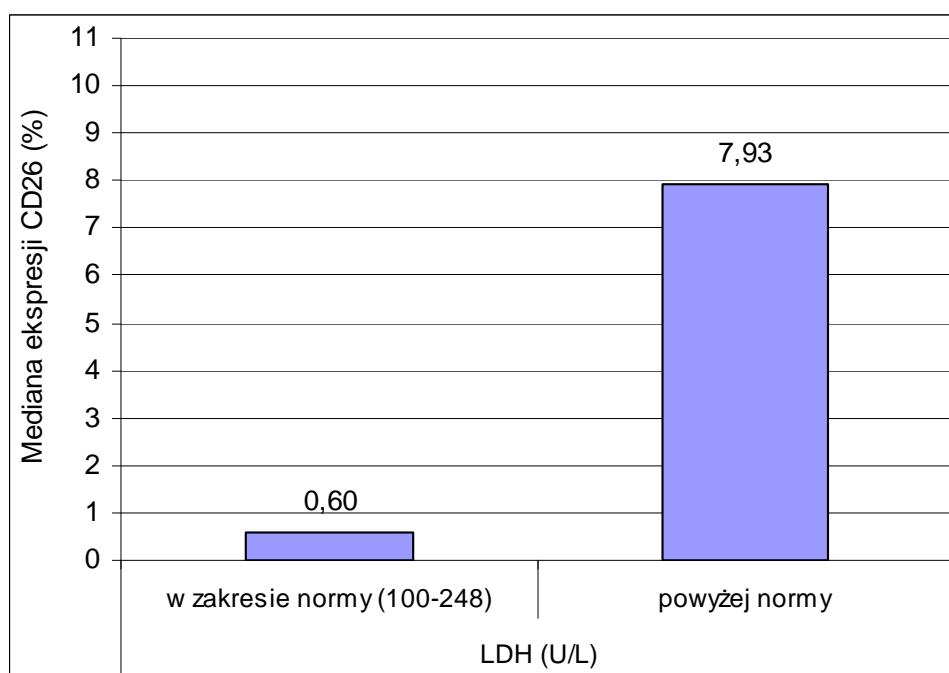
(CD5⁺CD19⁺CD23⁺) a aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) w surowicy krwi

Odsetek komórek z obecnością ekspresji CD26 okazał się być istotnie wyższy w grupie pacjentów z podwyższoną aktywnością LDH ($p = 0,0069^{**}$) (Rycina 21). Mediana odsetka komórek z obecnością ekspresji CD26 w grupie pacjentów z prawidłową aktywnością LDH ($n=62$) wyniosła 0,60%, natomiast w grupie pacjentów z podwyższoną aktywnością LDH ($n=27$) 7,93% (Rycina 22, Tabela 13, str. 105).

Rycina 21. Związek ekspresji antygenu CD26 na powierzchni komórek B-CLL ($CD5^+CD19^+CD23^+$) z aktywnością dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) w surowicy krwi chorych z B-CLL



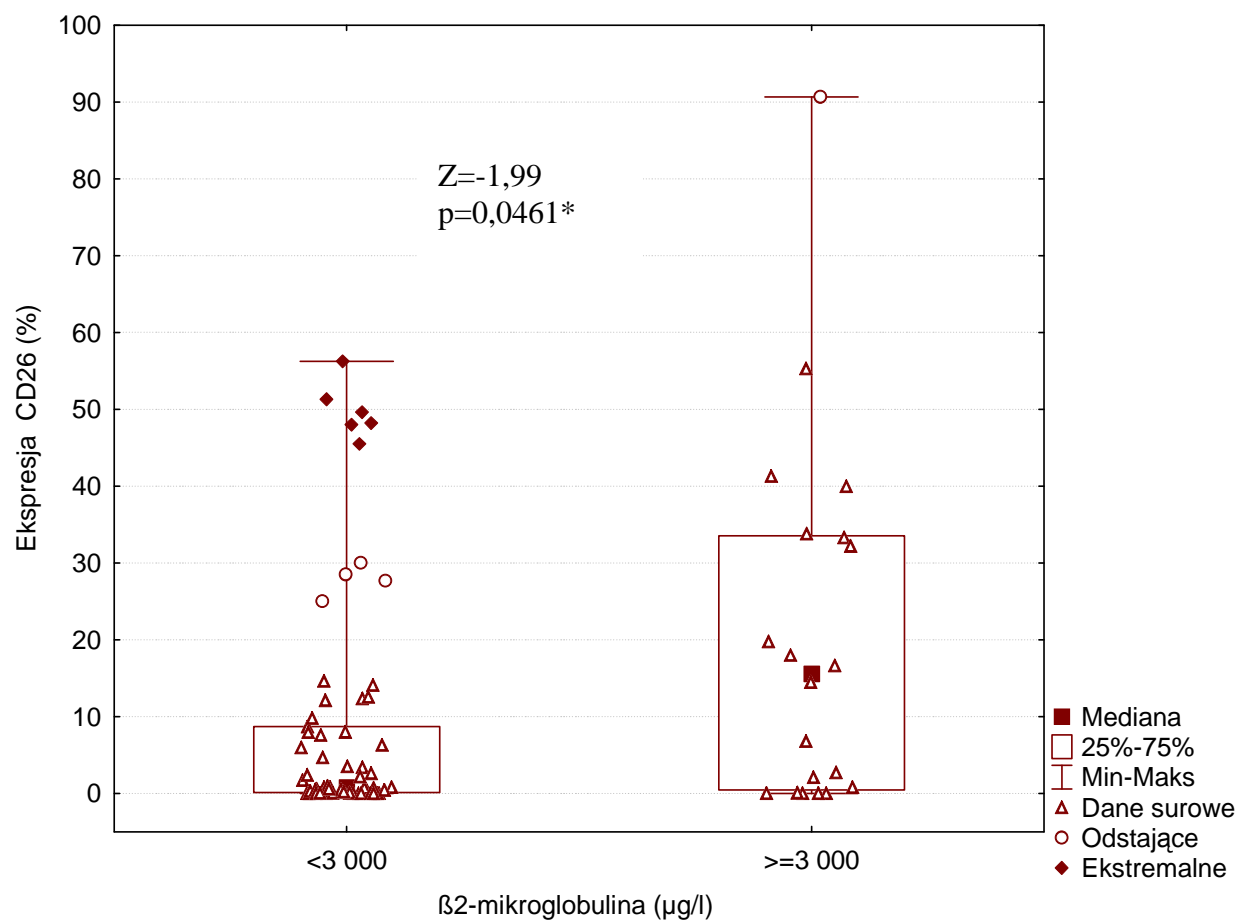
Rycina 22. Mediana ekspresji CD26 (%) na limfocytach białaczkowych w zależności od aktywności dehydrogenazy kwasu mlekowego (U/l)



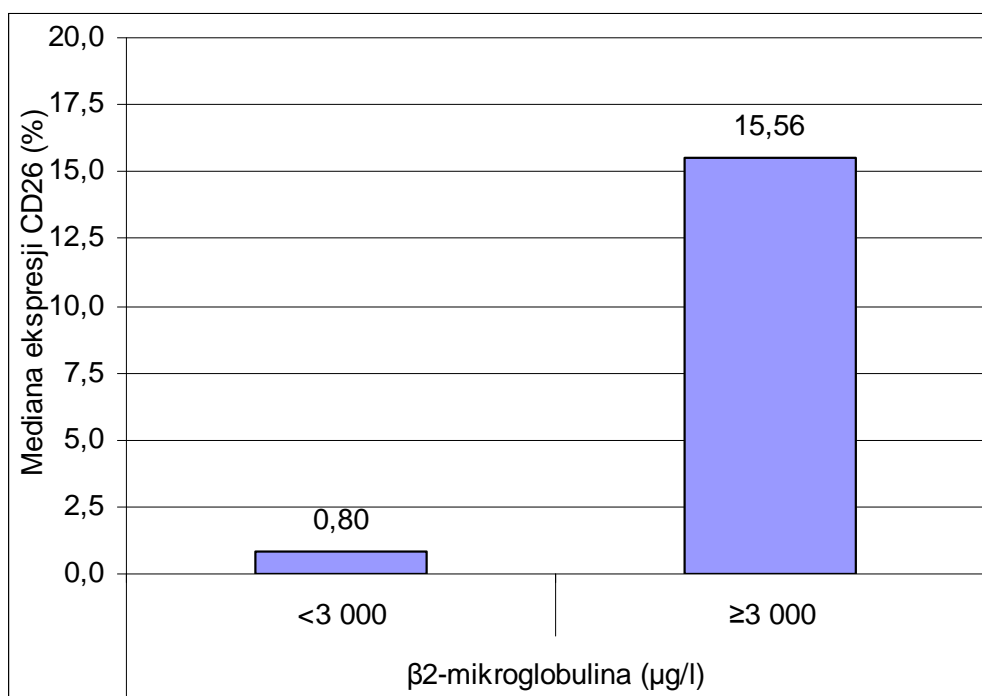
IV.2.3 Ekspresja CD26 na powierzchni komórek białaczkowych CD5⁺CD19⁺CD23⁺) a stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi

Odsetek komórek z obecnością ekspresji CD26 okazał się być istotnie wyższy w grupie pacjentów ze stężeniem β_2 -mikroglobuliny powyżej 3000 $\mu\text{g/l}$ ($p = 0,0461^*$) (Rycina 23). Mediana odsetka komórek wykazujących ekspresję CD26 u pacjentów ze stężeniem β_2 -mikroglobuliny poniżej 3000 $\mu\text{g/l}$ ($n = 65$) wyniosła 0,80%, natomiast u chorych ze stężeniem β_2 -mikroglobuliny powyżej 3000 $\mu\text{g/l}$ ($n = 20$) 15,56% (Rycina 24, Tabela 13, str. 105).

Rycina 23. Związek ekspresji antygenu CD26 na powierzchni komórek B-CLL ($CD5^+CD19^+CD23^+$) ze stężeniem β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi chorych z B-CLL



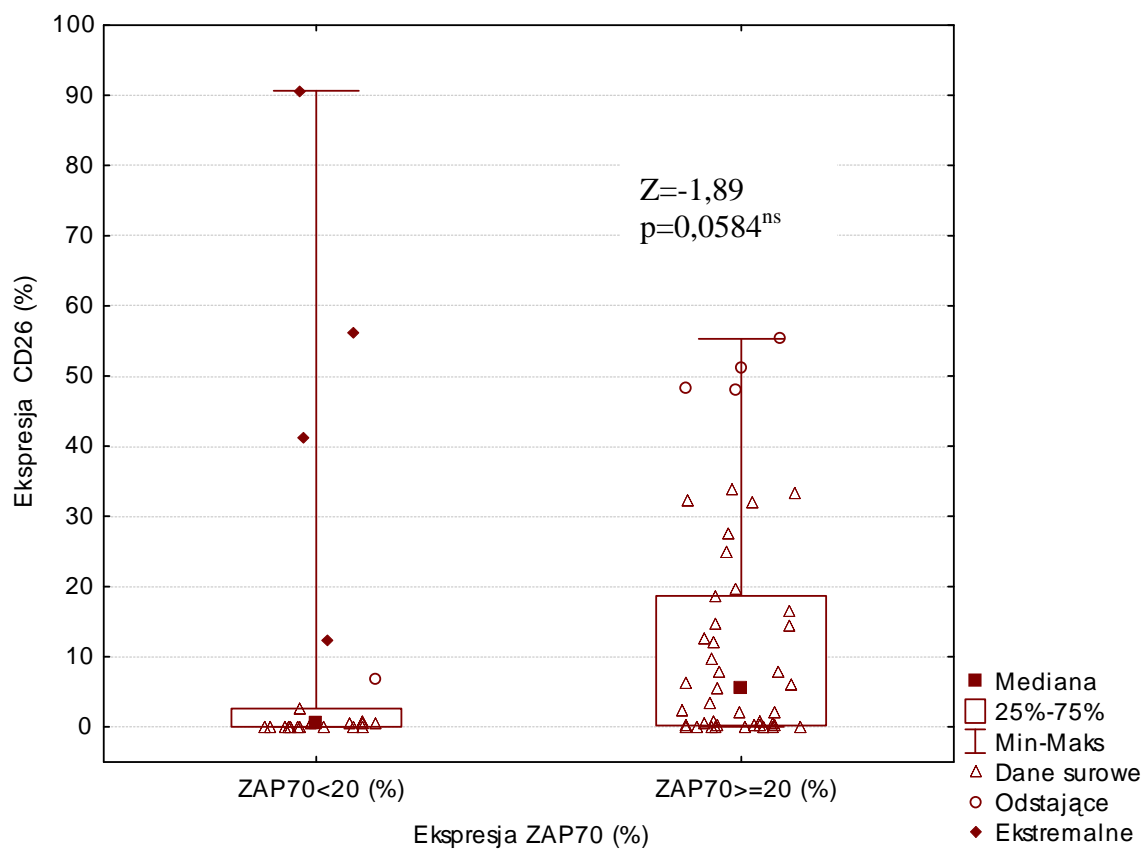
Rycina 24. Mediana ekspresji CD26 (%) na limfocytach białaczkowych w zależności od stężenia β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi chorych z B-CLL



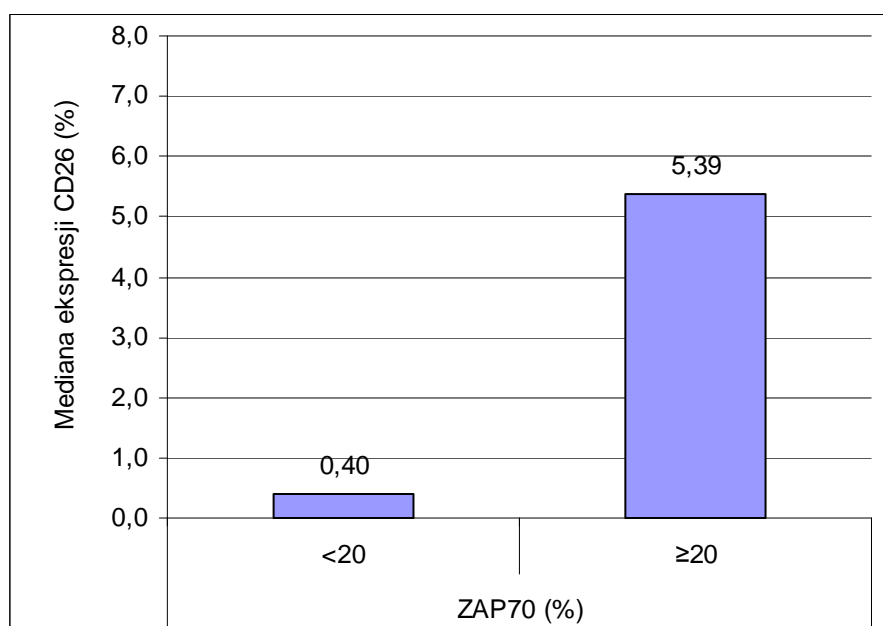
IV.2.4 Ekspresja antygenu CD26 na powierzchni komórek B-CLL ($\text{CD5}^+\text{CD19}^+\text{CD23}^+$) a ekspresja ZAP70

Pomiędzy grupą pacjentów z dodatnią (na $\geq 20\%$ komórek B-CLL) i ujemną (na $< 20\%$ komórek B-CLL) ekspresją ZAP70 nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w zakresie odsetka limfocytów z ekspresją CD26 (Rycina 25). Mediana odsetka komórek wykazujących ekspresję CD26 w grupie pacjentów z ekspresją ZAP70 na $< 20\%$ badanych limfocytów B-CLL ($n = 21$) wyniosła 0,4% i była niższa w porównaniu z grupą chorych z ekspresją ZAP70 na $\geq 20\%$ badanych limfocytów białaczkowych ($n = 45$) - 5,39% ($p = 0,0584^{\text{ns}}$) (Rycina 26, Tabela 13, str. 105).

Rycina 25. Związek ekspresji antygenu CD26 na powierzchni komórek białaczkowych B-CLL ($CD5^+CD19^+CD23^+$) z ekspresją cytoplazmatyczną ZAP70 u chorych z B-CLL



Rycina 26. Mediana ekspresji CD26 (%) w zależności od ekspresji ZAP70 w komórkach białaczkowych u chorych z B-CLL



IV.2.5 Ekspresja antygenu CD26 a ekspresja antygenu CD38 na powierzchni komórek białaczkowych (CD5⁺CD19⁺CD23⁺)

Wykonane badania nie potwierdziły związku pomiędzy odsetkiem komórek B-CLL z obecnością ekspresji CD26 a odsetkiem komórek B-CLL wykazujących ekspresję antygenu CD38. Mediana odsetka komórek z obecnością ekspresji antygenu CD26 na komórkach białaczkowych w grupie pacjentów CD38⁺ (n = 79) wyniosła 0,8%, a w grupie chorych CD38⁻ (n = 10) 8,31% (p = 0,0912^{ns}) (Tabela 13, str.105).

IV.2.6 Związek ekspresji dipeptydylopeptydazy IV (CD26) na komórkach białaczkowych z obecnością innych uznanych czynników rokowniczych

W badaniach potwierdzono występowanie korelacji pomiędzy odsetkiem komórek wykazujących ekspresję CD26 a stężeniem β_2 -mikroglobuliny (r = 0,32, p = 0,0030**) oraz stopniem klinicznego zaawansowania choroby według klasyfikacji Rai (r = 0,24, p = 0,0227*). Nie wykazano natomiast zależności pomiędzy odsetkiem komórek z ekspresją CD26 a aktywnością LDH oraz odsetkiem komórek z ekspresją CD26 a odsetkiem

komórek z ekspresją ZAP70 (Tabela 9, str. 68). Wyniki oceny zależności pomiędzy pozostałymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi przedstawiono w Tabeli 14 na str. 106.

Tabela 9. Ocena związku pomiędzy odsetkiem komórek CD19⁺CD5⁺CD23⁺ z obecnością CD26 a innymi uznanymi czynnikami rokowniczymi

Parametry	r	wartość p
Rai	0,24	0,0227*
β ₂ -mikroglobulina (μg/l)	0,32	0,0030**
LDH (U/l)	0,14	0,2067 ^{ns}
ZAP70 (%)	0,15	0,2345 ^{ns}

IV.3 Ekspresja dipeptydylopeptydazy IV (CD26) na komórkach białaczkowych a inne parametry kliniczne u chorych z B-CLL

IV.3.1 Ekspresja CD26 a płeć

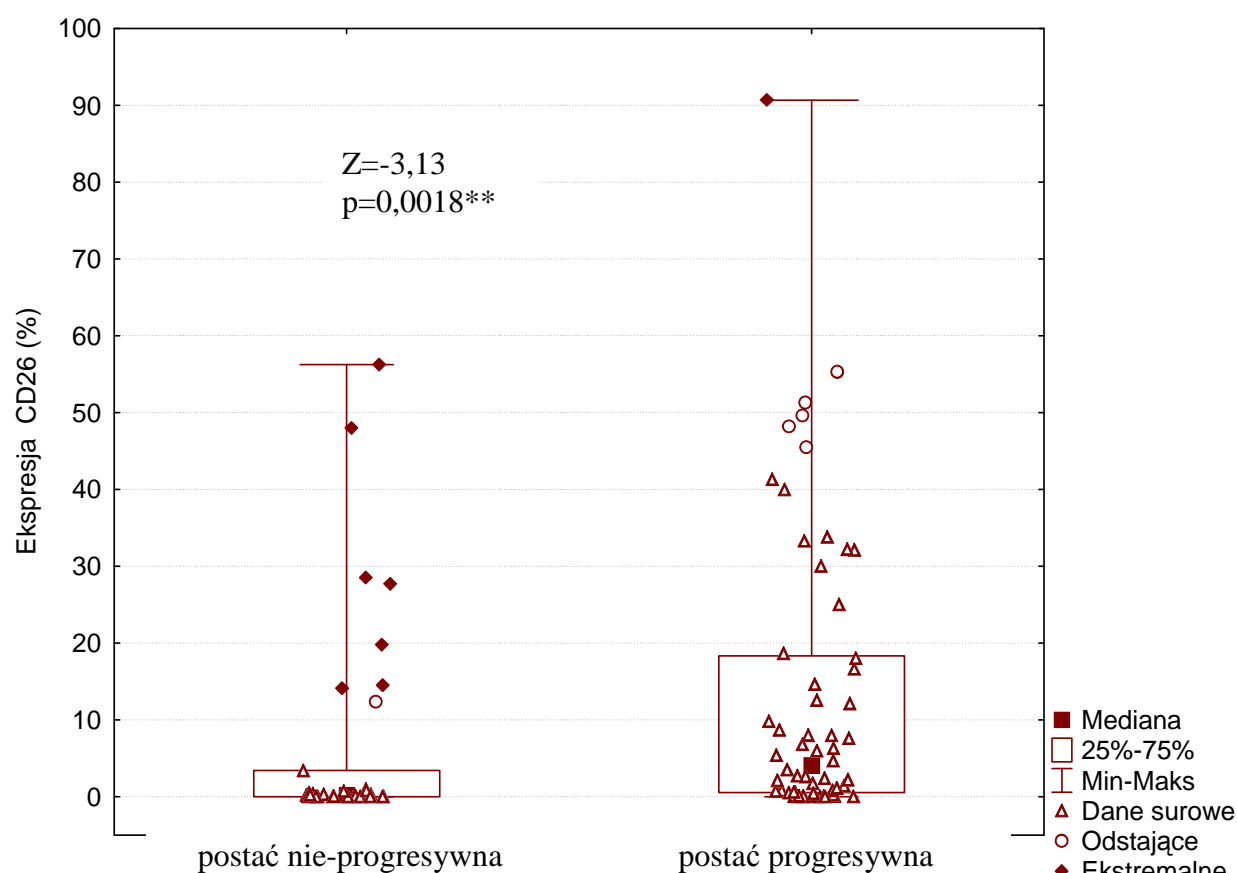
Nie potwierdzono istotnych różnic w ekspresji CD26 na komórkach B-CLL w zależności od płci badanych chorych ($p = 0,7189^{ns}$). W grupie badanych mężczyzn ($n = 50$) mediana odsetka komórek białaczkowych z obecnością ekspresji CD26 wyniosła 2,15%, a w grupie ocenionych kobiet ($n = 44$) 0,9% (Tabela 13, str. 105).

IV.3.2 Ekspresja CD26 a progresywna postać choroby

Pacjenci z progresywną i nie progresywną postacią B-CLL wykazywali istotne zróżnicowanie pod względem ekspresji CD26 ($p = 0,0018^{**}$) (Rycina 27). Mediana odsetka komórek z obecnością ekspresji CD26 w grupie chorych z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową, którzy do czasu zakończenia obserwacji pozostawali wolni od objawów progresji choroby i nie wymagali włączenia terapii przeciwnowotworowej ($n = 34$) wyniosła

0,20%. Była ona niższa niż w grupie chorych z progresywną postacią choroby (n = 60), którzy wymagali włączenia leczenia cytostaticznego. W przypadku tym mediana odsetka komórek z obecnością ekspresji CD26 wyniosła bowiem 4,1% (Rycina 27, Tabela 13, str. 105).

Rycina 27. Zmienność ekspresji antygenu CD26 na powierzchni komórek CD5⁺CD19⁺CD23⁺ w zależności od postaci klinicznej B-CLL (postać progresywna wymagająca rozpoczęcia terapii vs postać nie progresywna nie wymagająca leczenia)



IV.3.3 Ekspresja CD26 a czas do włączenia terapii przeciwnowotworowej (TTT)

Nie wykazano istotnego zróżnicowania ekspresji CD26 w zależności od czasu do włączenia leczenia ($p = 0,0812^{ns}$). Mediana odsetka komórek $CD5^+CD19^+CD23^+$ z obecnością ekspresji CD26 w grupie chorych z progresywną postacią przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej, którzy wymagali włączenia terapii przeciwnowotworowej w okresie < 12 miesięcy ($n = 30$) od rozpoznania choroby wyniosła 7,97%. Podobna ocena przeprowadzona u chorych, którzy wymagali włączenia leczenia dopiero po 12 miesiącach od chwili rozpoznania ($n = 29$) wyniosła 2,4% (Tabela 13, str. 105).

IV.3.4 Ekspresja CD26 a śmiertelność

Wykazano, że odsetek komórek we krwi z obecnością antygenu CD26 nie był powiązany ze śmiertelnością w tej populacji chorych. Mediana odsetka komórek białaczkowych wykazujących ekspresję CD26 u pacjentów, którzy zmarli w trakcie obserwacji wyniosła 5,32%, natomiast u pozostałych pacjentów 1,05% ($p = 0,3213^{ns}$) (Tabela 13, str. 105).

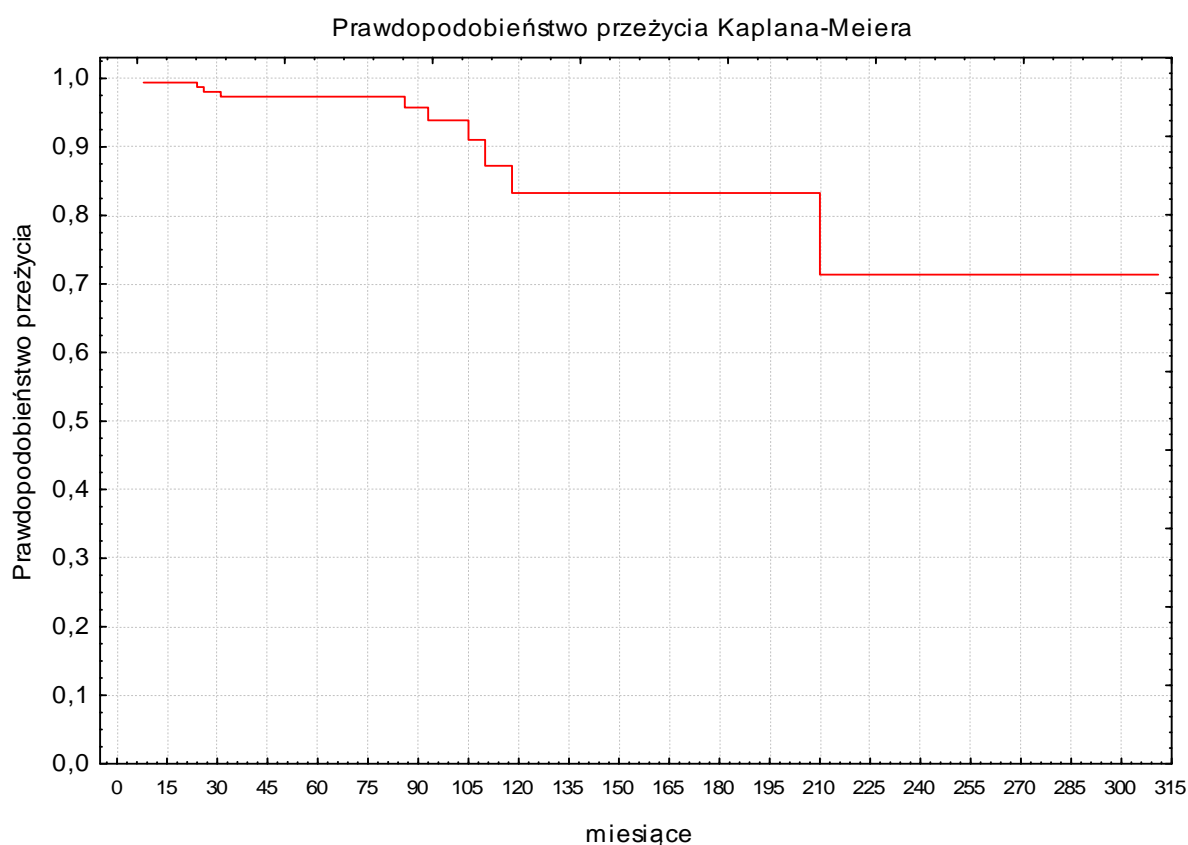
IV.4 Analizy przeżycia

Dla całej ocenianej grupy pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową, jak również dla poszczególnych grup pacjentów przeprowadzono analizę prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego metodą Kaplana-Meiera.

IV.4.1 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oraz włączenia leczenia cytostatycznego oznaczone za pomocą krzywej dla całej grupy badanych z B-CLL – analiza za pomocą krzywych Kaplana-Meiera

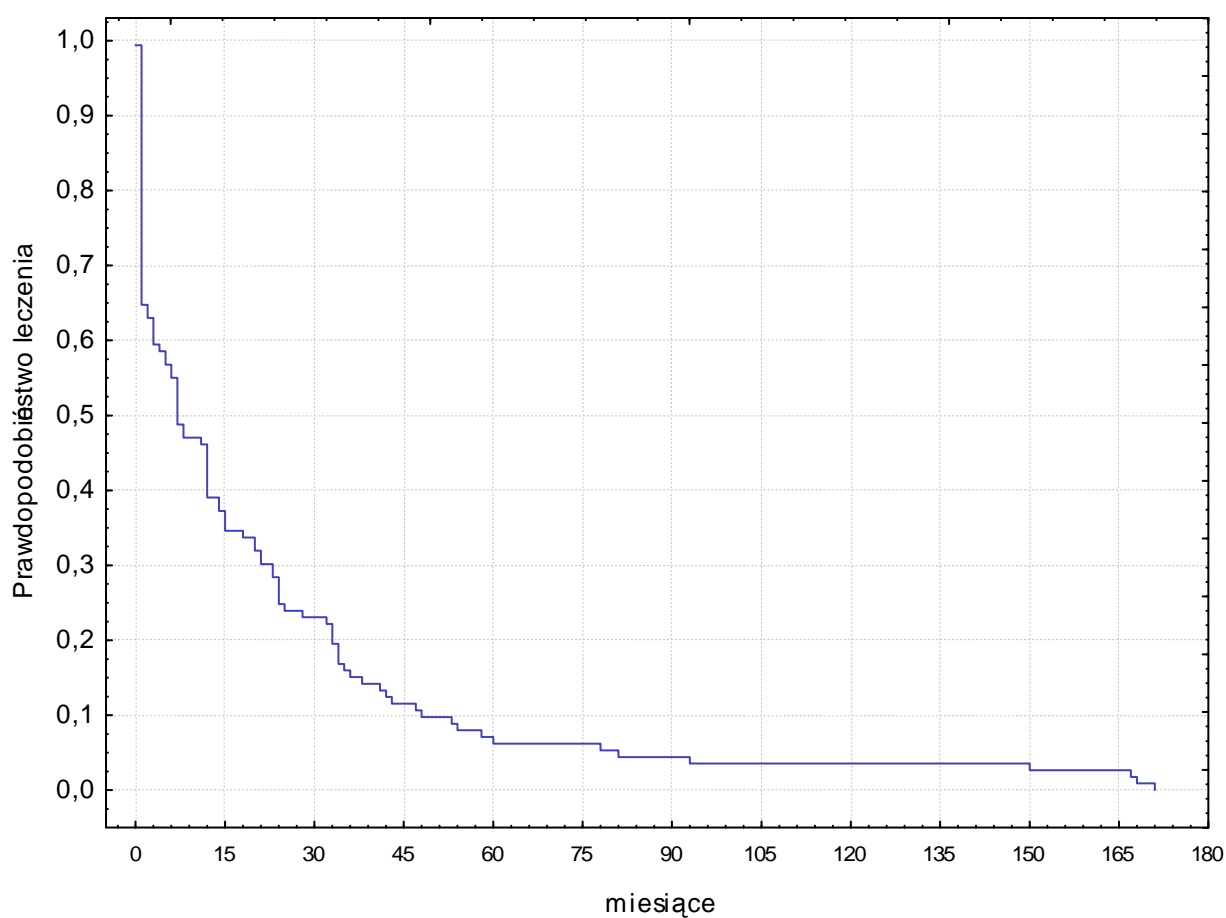
Dla całej badanej grupy pacjentów z B-CLL (n=162) oszacowano prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia za pomocą analizy Kaplana-Meiera. Mediana czasu obserwacji wyniosła 70 miesięcy (Tabela 6, str. 36). Na poniższym wykresie przedstawiono prawdopodobieństwo OS po 311 miesiącach obserwacji. Określenie mediany czasu przeżycia nie było możliwe, gdyż krzywa nie osiągnęła prawdopodobieństwa 50% (Rycina 28, 30).

Rycina 28. Prawdopodobieństwo przeżycia całkowitego (OS) dla całej grupy badanej

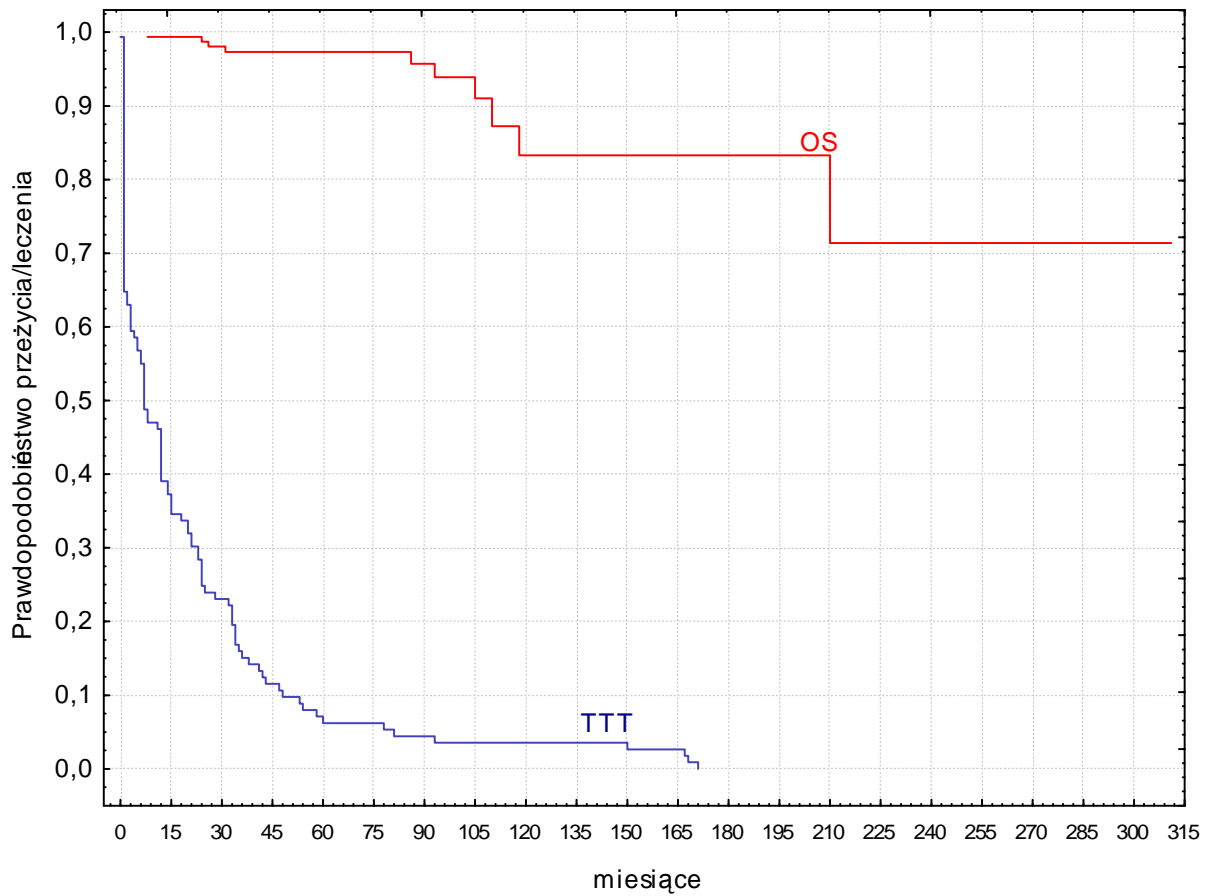


Analiza przebiegu krzywej Kaplana-Meiera wskazuje, że znaczna część pacjentów wymaga rozpoczęcia terapii w ciągu 7 miesięcy od rozpoznania choroby. Na tej podstawie określono także prawdopodobieństwo włączenia leczenia po upływie 7 miesięcy od rozpoznania choroby. Wyniosło ono 59% (Rycina 29, 30).

Rycina 29. Prawdopodobieństwo włączenia leczenia cytostatycznego u chorych z B-CLL w poszczególnych miesiącach od rozpoznania schorzenia (czas do włączenia leczenia 1-171 miesięcy, n=113)



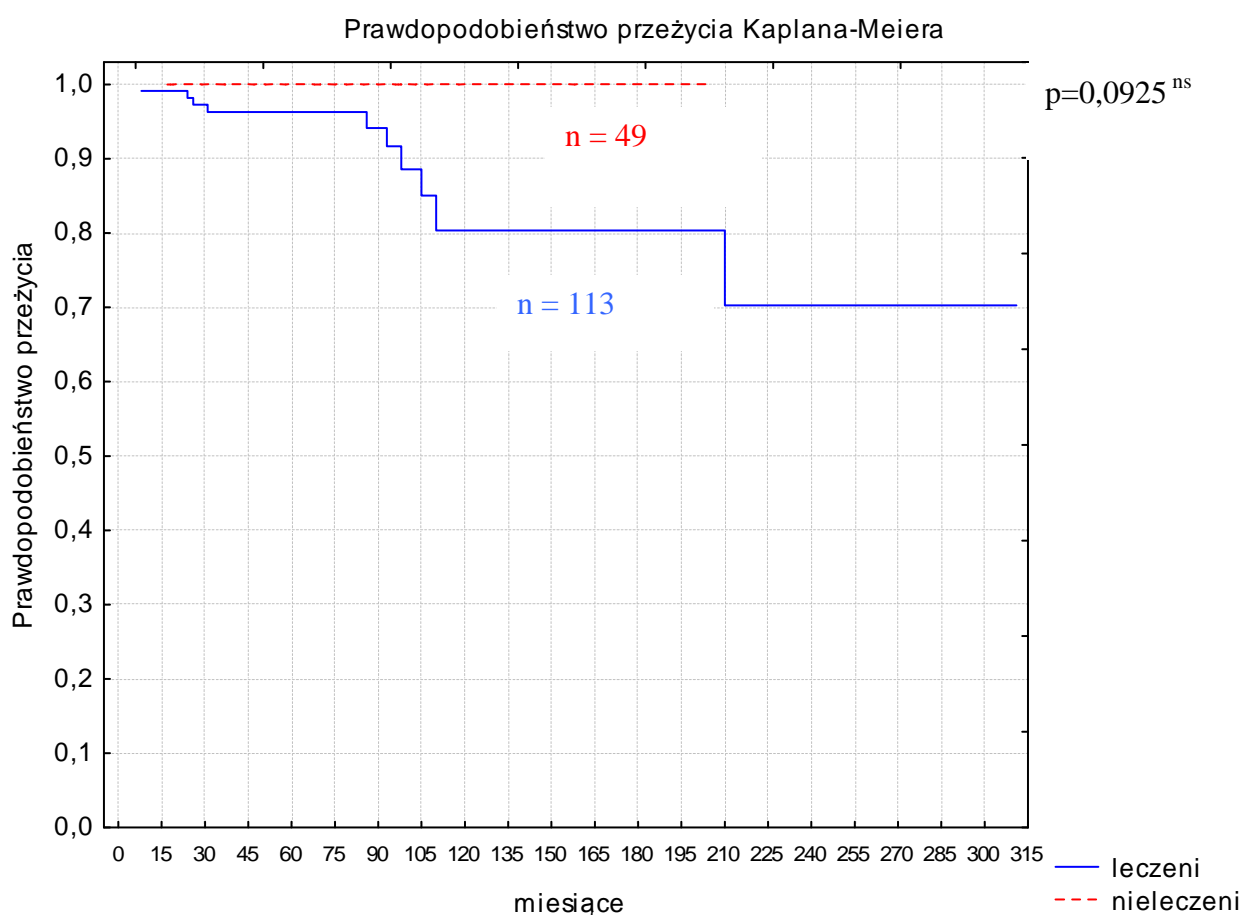
Rycina 30. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia (OS) i czasu do podjęcia leczenia (TTT) w badanej grupie pacjentów z B-CLL – analiza Kaplana-Meiera



IV.4.2 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów z progresywną i nie-progresywną postacią choroby oznaczone za pomocą krzywej Kaplana-Meiera

W grupie pacjentów z nie-progresywną postacią B-CLL prawdopodobieństwo OS było wyższe niż u chorych z postacią progresywną. Różnica ta nie była jednak istotna statystycznie ($p=0,0925^{ns}$) (Rycina 31). Należy jednak zaznaczyć, że wszyscy chorzy, którzy zmarli w okresie obserwacji należeli do grupy z progresywną postacią choroby i wymagali rozpoczęcia terapii przeciwnowotworowej.

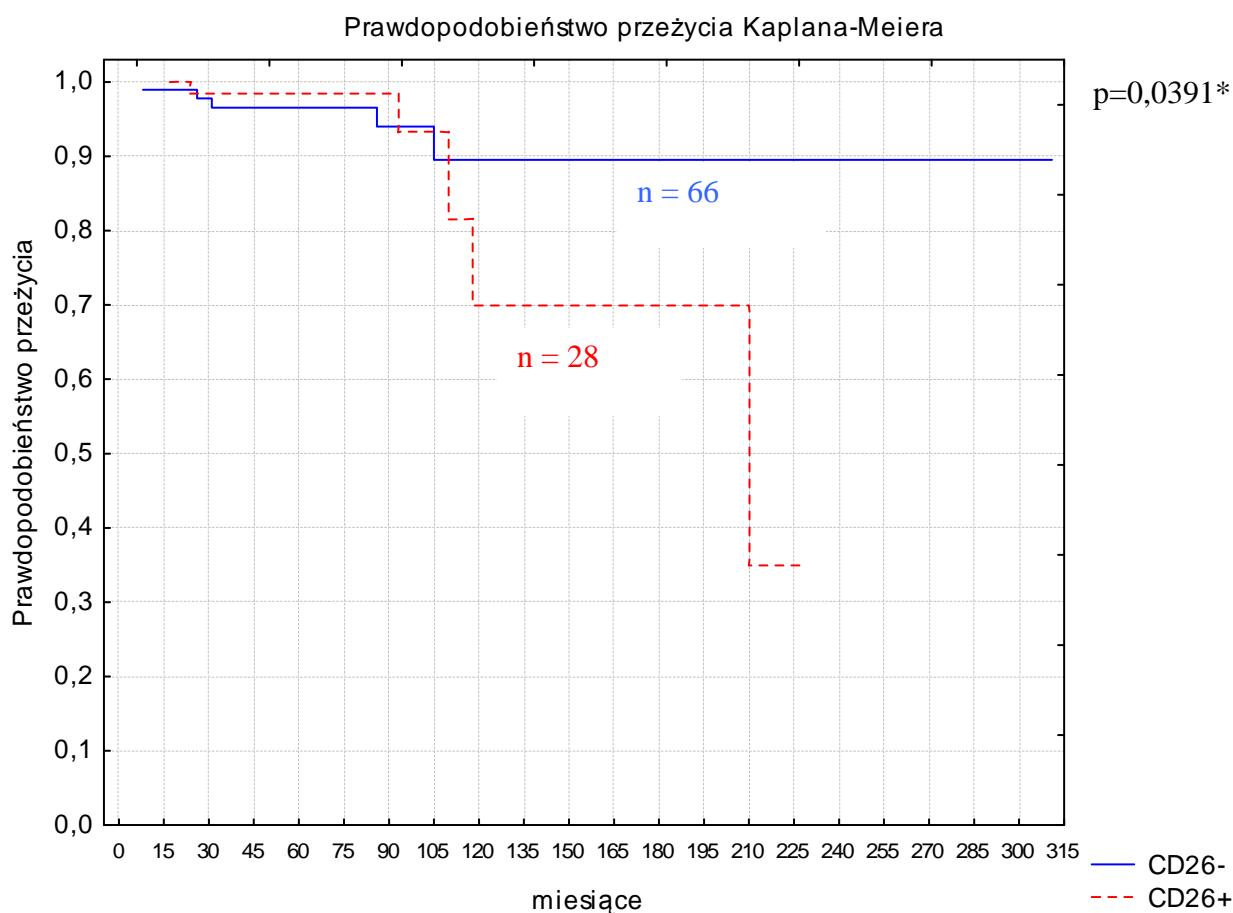
Rycina 31. Analiza Kaplana-Meiera prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego dla pacjentów wymagających i niewymagających rozpoczęcia leczenia cytostatycznego w trakcie trwania okresu aktywnej obserwacji



IV.4.3 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów CD5⁺CD19⁺CD23⁺CD26⁺ oraz CD5⁺CD19⁺CD23⁺CD26⁻ oznaczone za pomocą krzywej Kaplana-Meiera

Analizę prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego przeprowadzono oddzielnie dla grupy chorych CD26⁺ oraz CD26⁻. Prawdopodobieństwo dłuższego OS w grupie CD26⁺ było istotnie niższe niż w grupie pacjentów CD26⁻ ($p=0,0391^*$) (Rycina 32).

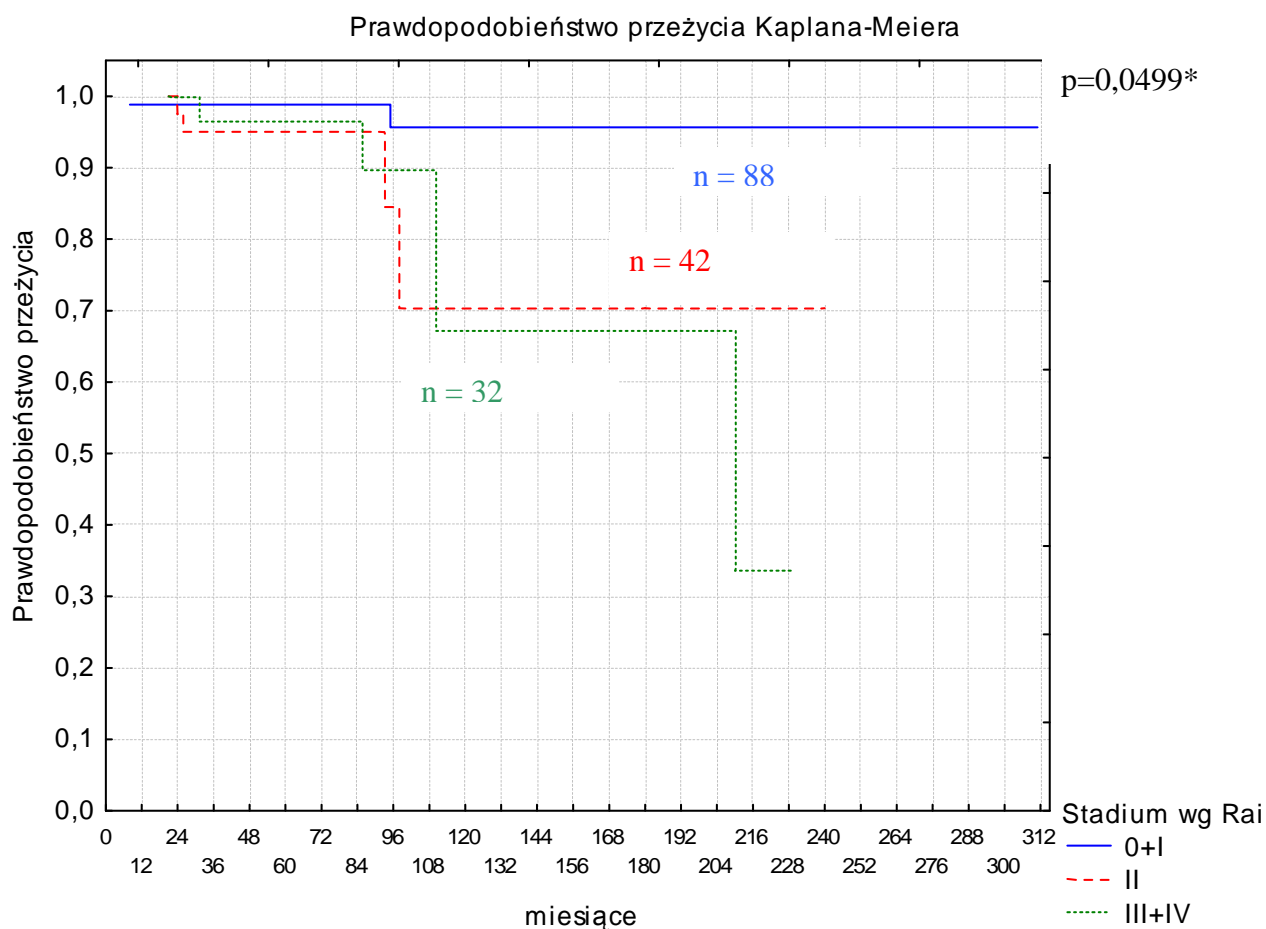
Rycina 32. Analiza Kaplana-Meiera prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego dla pacjentów CD26⁻ i CD26⁺



IV.4.4 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów w poszczególnych stadiach zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai oznaczone za pomocą krzywej Kaplana-Meiera

Analiza przeżycia całkowitego wykazała występowanie istotnych różnic w przeżyciu całkowitym pomiędzy pacjentami w zależności od okresu zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai w chwili rozpoznania B-CLL ($p = 0,0499^{**}$) (Rycina 33).

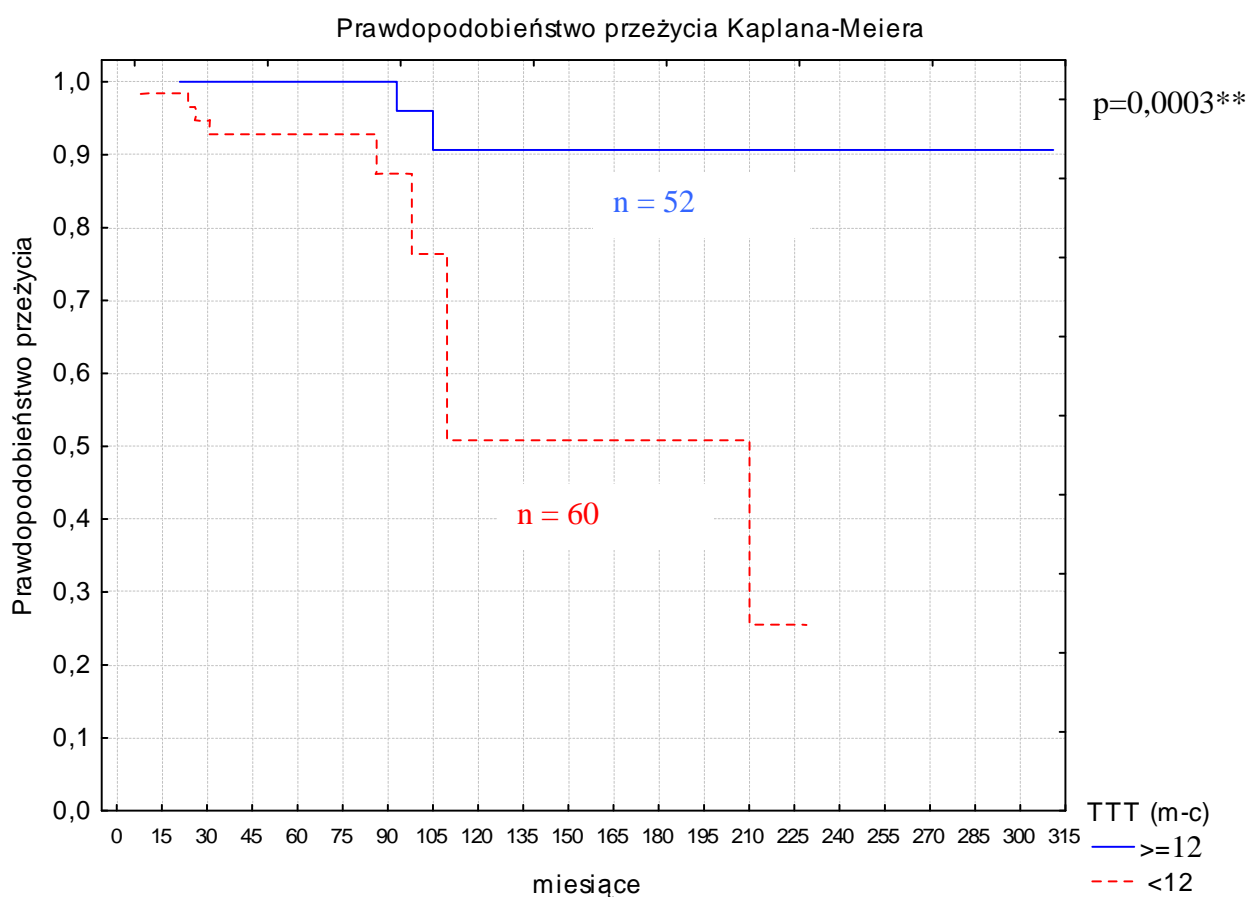
Rycina 33. Prawdopodobieństwo przeżycia całkowitego dla pacjentów w poszczególnych stadiach zaawansowania klinicznego przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej według klasyfikacji Rai (w chwili rozpoznania choroby) – analiza Kaplana-Meiera



IV.4.5 Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia pacjentów wymagających leczenia przeciwnowotworowego przed i po upływie 12 miesięcy od rozpoznania

Wykazano, że prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia istotnie różni się w grupie chorych wymagających leczenia przed upływem 12 miesięcy od rozpoznania choroby w porównaniu do grupy pacjentów, u których leczenie włączono później ($p = 0,0003^{**}$) (Rycina 34).

Rycina 34. Analiza Kaplana-Meiera prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego dla pacjentów wymagających leczenia przed i po upływie 12 miesięcy od rozpoznania choroby



Objaśnienia: TTT (ang. time to treatment) – czas do podjęcia leczenia

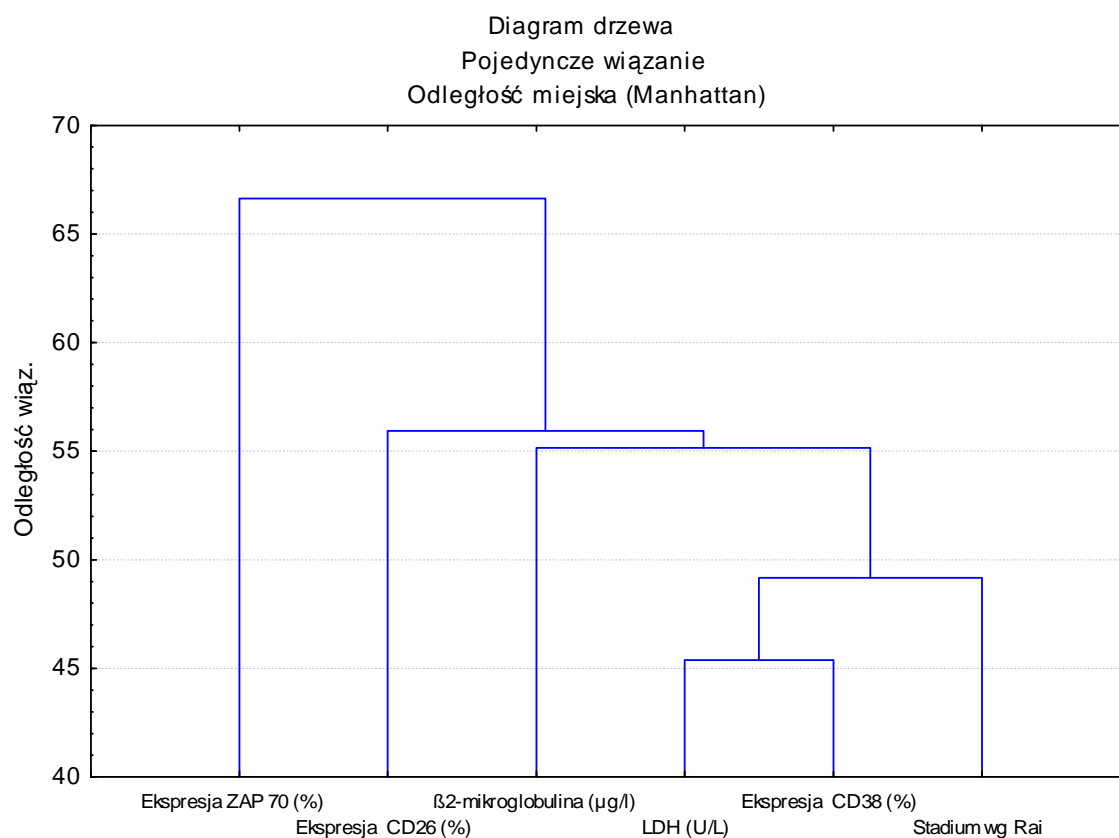
IV.5 Pozostałe analizy

IV.5.1 Analiza zależności pomiędzy zmiennymi tworzącymi nowe hipotetyczne grupy rokownicze chorych z B-CLL. Analiza skupień przeprowadzona metodą aglomeracji oraz metodą k-średnich.

Przyjęcie sformułowanych wcześniej założeń teoretycznych wymagało zastosowania modelu statystycznego, który umożliwi określenie zmiennych tworzących hipotetyczne grupy rokownicze oraz pokaże rodzaj występujących zależności pomiędzy tymi zmiennymi. W związku z tym przeprowadzono analizę skupień metodą aglomeracji. Polega ona na tworzeniu skupień, począwszy od połączenia dwóch najbardziej podobnych obiektów, a następnie na kolejnym dołączaniu obiektów lub łączeniu skupień ze względu na ich podobieństwo, aż do uzyskania skupienia mocnego, które integruje wszystkie skupienia niższych poziomów. Przyjęto, że zmiennymi tworzącymi grupy rokownicze pacjentów z B-CLL są ekspresja CD26, CD38 i ZAP70, aktywność LDH (U/l), stężenie β_2 -mikroglobuliny oraz zaawansowanie kliniczne choroby według klasyfikacji Rai.

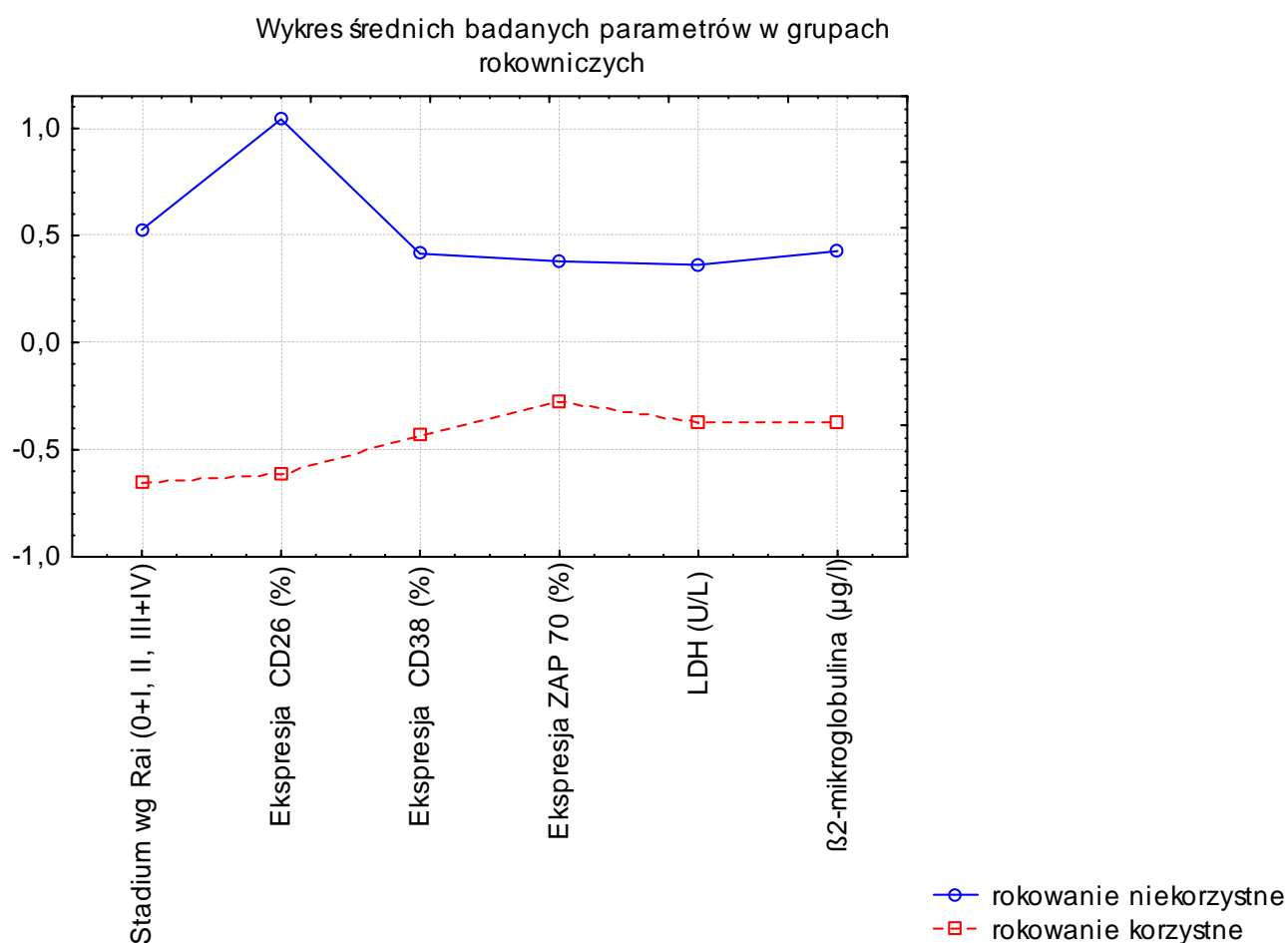
W celu określenia odległości między skupieniami wykorzystano metodę pojedynczego wiązania. W procedurach hierarchicznych istnieje możliwość graficznego przedstawienia wyników w postaci dendrogramu (drzewka połączeń), które ilustruje kolejne połączenia skupień coraz to wyższego rzędu. Uzyskana hierarchia pozwala na określenie wzajemnego położenia skupień i obiektów w nich zawartych. Otrzymane wyniki analizy skupień przeprowadzonej metodą aglomeracji przedstawiono za pomocą dendrogramu, obrazującego uzyskane skupienia (Rycina 35).

Rycina 35. Dendrogram przedstawiający powiązania pomiędzy zmiennymi (czynniki rokownicze) tworzącymi nowe grupy rokownicze pacjentów z B-CLL



Kolejnym krokiem grupowania, które zostało zastosowane w dodatkowej analizie, była analiza skupisk przeprowadzona metodą k-średnich. W analizie skupień metodą aglomeracji przeprowadzonej w tej samej grupie zmiennych wyodrębniono dwie najdłuższe odległości wiązań, co pomogło we wskazaniu ilości skupień podczas przeprowadzania analizy metodą k-średnich.

Rycina 36. Przedstawienie wartości średnich analizowanych parametrów w hipotetycznych grupach rokowniczych



Decyzja podjęta odnośnie ilości skupień okazała się być trafna, gdyż otrzymane skupienia różniły się układem wymienionych zmiennych rokowniczych. Przedstawiony powyżej wykres średnich obrazuje zróżnicowanie zmiennych w obrębie każdego skupienia (Rycina 36). W celu sprawdzenia na ile dobrze dana zmienna różnicuje uzyskane skupienia przeprowadzono analizę wariancji, której wyniki przedstawiono w Tabeli 10 na str. 81.

Tabela 10. Wyniki analizy wariancji przeprowadzonej w obszarze zmiennych rokowniczych u pacjentów z B-CLL

Rokowanie	korzystne	niekorzystne	wartość p
Parametry laboratoryjne (wartość średnia)			
Ekspresja CD26 (%)	3,4	26,7	0,0000**
Ekspresja CD38 (%)	5,2	26,6	0,0001**
Ekspresja ZAP 70 (%)	31,5	49,9	0,0057**
LDH (U/l)	203,0	328,2	0,0000**
β ₂ -mikroglobulina (μg/l)	2019,7	3069,2	0,0005**
Zaawansowanie kliniczne wg Rai			
0+I	89%	25%	
II	9%	43%	0,0000**
III+IV	2%	32%	

Uzyskane wyniki wskazują, że wszystkie wyróżnione zmienne różnicują otrzymane grupy rokownicze pacjentów z B-CLL. W grupie o rokowaniu korzystnym znaleźli się bowiem chorzy charakteryzujący się niskim odsetkiem komórek białaczkowych z ekspresją CD26 ($\bar{x}=3,4$), CD38 ($\bar{x}=5,2$), ZAP70 ($\bar{x}=31,5$), niską aktywnością LDH (U/l) ($\bar{x}=203,0$), niskim stężeniem β₂-mikroglobuliny (μg/l) ($\bar{x}=2019,7$) oraz niskim zaawansowaniem klinicznym choroby wg klasyfikacji Rai (0+I). W grupie o rokowaniu niekorzystnym znalazły się osoby charakteryzujące się wysokim odsetkiem komórek białaczkowych wykazujących ekspresję CD26 ($\bar{x}=26,7$), CD38 ($\bar{x}=26,7$), ZAP70 ($\bar{x}=49,9$), wysoką aktywnością LDH (U/l) ($\bar{x}=328,2$), wysokim stężeniem β₂-mikroglobuliny (μg/l) ($\bar{x}=3069,2$) oraz wysokim (III+IV) i pośrednim (II) zaawansowaniem klinicznym choroby wg klasyfikacji Rai.

Dzięki utworzeniu za pomocą analizy skupień dwóch grup rokowniczych uzyskano istotne zróżnicowanie pomiędzy powstałymi grupami parametrów laboratoryjnych takich jak ilość leukocytów (G/l) (p = 0,0229*), ilość limfocytów (G/l) (p = 0,0274*) i stężenie hemoglobiny (mmol./l) (p = 0,0126*) we krwi obwodowej w chwili rozpoznania B-

CLL. W porównaniu do chorych o niekorzystnym rokowaniu w grupie o korzystnym rokowaniu liczba leukocytów ($\bar{x}=36,95$) i limfocytów ($\bar{x}=30,96$) była niższa, a stężenie hemoglobiny ($\bar{x}=8,61$) wyższe (Tabela 11, str. 82).

Tabela 11. Zróżnicowanie parametrów laboratoryjnych pomiędzy grupami u pacjentów z B-CLL o rokowaniu korzystnym i niekorzystnym

Rokowanie	Korzystne	niekorzystne	wartość p
Parametry laboratoryjne (wartość średnia)			
leukocyty (G/l)	36,95	62,92	0,0229*
limfocyty (G/l)	30,96	55,77	0,0274*
hemoglobina (mmol/l)	8,61	7,41	0,0126*

Zaobserwowano istotne zróżnicowanie pomiędzy grupami rokowniczymi a odsetkiem osób wymagających terapii przeciwnowotworowej ($p=0,0002^{**}$). W grupie o rokowaniu niekorzystnym aż 86% pacjentów wymagało leczenia, podczas gdy w grupie osób o rokowaniu korzystnym tylko 40%. Istotne zróżnicowanie wykazano również pomiędzy grupami rokowniczymi a długością TTT ($p=0,0436^*$). W grupie o niekorzystnym rokowaniu aż 75% badanych wymagało włączenia terapii przed upływem 12 miesięcy od rozpoznania, natomiast w grupie o rokowaniu korzystnym tylko 44%.

IV.5.2 Analiza związku pomiędzy obecnością del 11q22-23, del 13q14.3 i del 17p13 w komórkach B-CLL a liczbą komórek CD5⁺CD19⁺CD23⁺CD26⁺

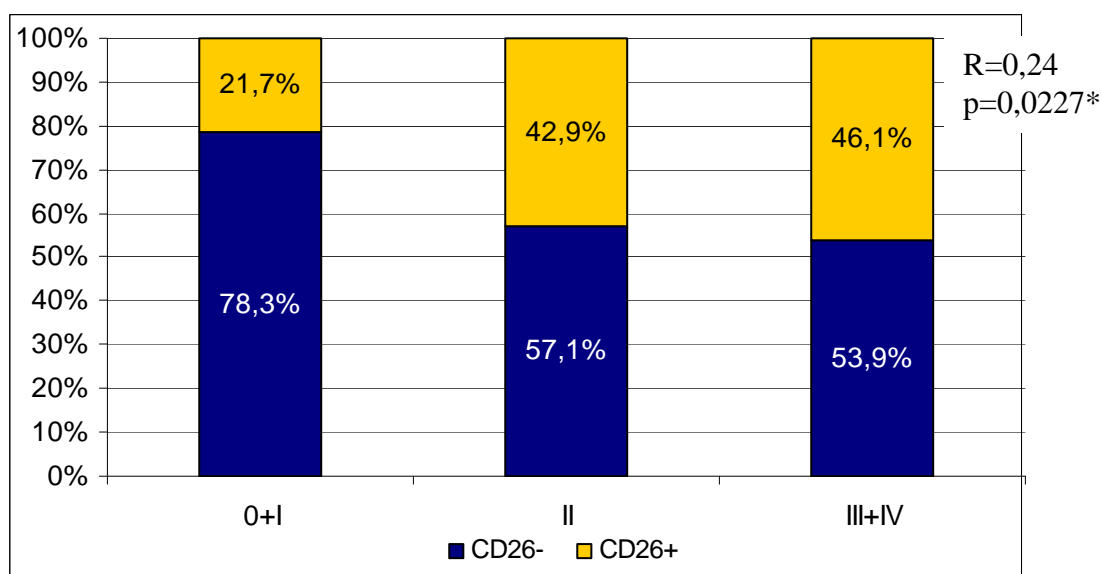
Żadne z ocenianych zaburzeń cytogenetycznych nie było istotnie powiązane z ekspresją CD26 na komórkach CD5⁺CD19⁺CD23⁺ (Tabela 15, 16, str. 106, Tabela 17, str. 107).

IV.5.3 Porównanie wybranych parametrów laboratoryjnych w grupie pacjentów CD26⁺ i CD26⁻

U chorych CD26⁺ stężenie β_2 -mikroglobuliny było istotnie wyższe (średnia 2767,58 $\mu\text{g/l}$, mediana 2194,2 $\mu\text{g/l}$) w porównaniu z grupą chorych CD26⁻ (średnia 2134,75 $\mu\text{g/l}$, mediana 1765,00 $\mu\text{g/l}$) ($p=0,0040^{**}$) (Tabela 18, str.. 107).

Okazało się także, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania według klasyfikacji Rai zwiększa się odsetek pacjentów CD26⁺. I tak, wśród chorych z 0 i I stopniem zaawansowania klinicznego tylko u 22% chorych potwierdzono ekspresję CD26 na $\geq 10\%$ komórek białaczkowych. W przypadku II oraz III-IV stopnia zaawansowania zmian odsetek ten wyniósł odpowiednio 43% i 46% ($p = 0,02267^*$, $r = 0,24$) (Rycina 37).

Rycina 37. Zależność pomiędzy okresem zaawansowania klinicznego B-CLL według klasyfikacji Rai a odsetkiem komórek CD26⁺



IV.5.4 Czas do włączenia leczenia (TTT)

Wśród badanych pacjentów 70% wymagało włączenia leczenia cytostatycznego w chwili rozpoznania choroby lub w trakcie trwania aktywnej obserwacji. W grupie tej TTT wyniósł średnio 21 miesięcy (zakres 1 - 171 miesięcy) (Tabela 6, str. 36). Prawdopodobieństwo konieczności włączenia leczenia przeciwnowotworowego przedstawiono na Rycinie 29. Chorzy, którzy wymagali włączenia terapii w czasie krótszym niż 12 miesięcy od rozpoznania stanowili 54% ogółu badanych ogółu badanych. U pozostałych 46% leczenie rozpoczęto później. W powyższych grupach pacjentów obserwowano istotne zróżnicowanie stopnia zaawansowania klinicznego według klasyfikacji Rai. Wśród chorych, u których leczenie przeciwnowotworowe podjęto przed upływem 12 miesięcy od rozpoznania u 12% potwierdzono I i 0, u 38% II, natomiast u 50% III i IV stopień zaawansowania klinicznego choroby. W grupie chorych, u których leczenie rozpoczęto po upływie 12 miesięcy od rozpoznania u 69% stwierdzono 0 i I, natomiast u 31% II stopień zaawansowania choroby według klasyfikacji Rai ($p < 0,0000^{**}$) (Tabela 19, str. 107). Wymienione grupy różniły się również odsetkiem pacjentów $CD26^+$ i $CD26^-$. W grupie chorych wymagających inicjacji terapii przed upływem 12 miesięcy od rozpoznania pacjenci $CD26^+$ stanowili 53%, a $CD26^-$ 47% ogółu badanych. Odsetek ten wśród chorych, u których terapię rozpoczęto po 12 miesiącach od rozpoznania wynosił odpowiednio 20% i 80%. ($p = 0,0351^*$) (Tabela 20, str. 108). Aktywność LDH także była różna. W grupie pacjentów wymagających podjęcia leczenia przed upływem 12 miesięcy od rozpoznania tylko u 38% aktywność LDH była prawidłowa. Przeciwnie u chorych, którzy wymagali inicjacji leczenia w okresie późniejszym aż u 60% aktywność LDH była prawidłowa ($p = 0,0211^*$) (Tabela 21, str. 108.). Pozostałe analizowane parametry, takie jak ekspresja CD38, ZAP70 na komórkach białaczkowych, stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi, czy obecności nieprawidłowości chromosomalnych nie różnicowały chorych z TTT $<$ i $>$ 12 miesięcy (Tabela 22, 23 str. 108, Tabela 24, str. 109).

IV.5.5 Analiza pozostałych czynników rokowniczych

Analiza związku pomiędzy zaawansowaniem choroby według klasyfikacji Rai a ekspresją CD38 na komórkach B-CLL wykazała, że mediana ekspresji antygenu CD38 zwiększa się wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego choroby. I tak, dla

pacjentów w 0-I⁰ wyniosła ona 1,60%, w II⁰ – 8,6%, natomiast w III-IV⁰ – 9,40% ($p=0,0003^{**}$) (Tabela 25, str. 109). Okazało się także, że wśród pacjentów CD38⁺ 62% było w 0-I, 21% w II, a tylko 16% w III-IV okresie zaawansowania zmian chorobowych ($p=0,0371^*$, $r=0,2387$) (Tabela 26, str. 110). Analiza ekspresji ZAP70 wykazała, iż rośnie ona wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego według Rai. Mediana ekspresji ZAP70 u pacjentów w 0-I⁰ wyniosła 27%, w II⁰ – 50%, natomiast w III-IV⁰ – 57,5% ($p=0,0039^{**}$). Potwierdzono także, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego choroby według Rai wzrasta mediana aktywności LDH w surowicy krwi. Dla pacjentów w 0-I⁰ wyniosła ona bowiem 176,5, II⁰ – 243, natomiast III-IV⁰ – 274 ($p=0,0000^{**}$). Wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego według Rai wzrastała także mediana stężenia β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi: u pacjentów w 0-I stopniu zaawansowania zmian wyniosła ona 1851,60 $\mu\text{g/l}$, w II⁰ 2496 $\mu\text{g/l}$, natomiast w III-IV⁰ 2499,15 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,0213^*$). Wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby według klasyfikacji Rai obserwowano również wzrost mediany bezwzględnej liczby leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej (leukocyty – $p=0,0006^{**}$; limfocyty – $p=0,0145^*$) (Tabela 25, str. 109).

V DYSKUSJA

Jak dotąd nie ustalono jednolitych standardów dotyczących optymalnego sposobu leczenia poszczególnych chorych z B-CLL. Zgodnie z powszechnie akceptowanymi zasadami leczenie należy podjąć w każdym przypadku choroby o charakterze progresywnym oraz w przypadkach przebiegających z zależną od nacieczenia szpiku cytopenią we krwi obwodowej. Nie budzi także wątpliwości terapia osób w podeszłym wieku, u których preferowane jest stosowanie monoterapii za pomocą leków alkilujących. Także czas podjęcia terapii cytostatycznej wydaje się mieć kluczowe znaczenie. Zbyt wczesne jej rozpoczęcie może prowadzić do zwiększenia częstości występowania powikłań krwotocznych oraz infekcyjnych wskutek nasilenia lub wywołania leukopenii oraz małopłytkowości we krwi obwodowej. Odrębnym zagadnieniem jest skuteczność dotychczasowych metod terapii B-CLL. Aktualne dane wskazują bowiem na to, że ich zastosowanie prowadzi do uzyskania odpowiedzi hematologicznych u większości pacjentów (w tym całkowitych remisji, a nawet całkowitych remisji cytometrycznych), wydłużenia czasu do progresji choroby (PFS, *ang. progression free survival*) nie wpływając jednak na czas całkowitego przeżycia.

Potwierdzeniem tej strategii są m.in. dane wynikające z metaanalizy przeprowadzonej na grupie 2048 pacjentów z B-CLL. Potwierdziły one, że rozpoczęcie terapii lekami alkilującymi u chorych we wczesnych fazach B-CLL (0-I) nie przedłuża ich całkowitego przeżycia [72]. I tak, zastosowanie chlorambucilu w monoterapii lub w skojarzeniu z prednizolonem pozwala na uzyskanie odpowiedzi hematologicznej u około 60 - 90% pacjentów z B-CLL. Remisję całkowitą uzyskuje jednak zaledwie 20% chorych [72-77,79], a badania randomizowane nie wykazały wpływu tak prowadzonej terapii na OS [73].

Inną grupą leków znajdującą zastosowanie w leczeniu B-CLL są analogi puryn, takie jak fludarabina, kladrybina czy pentostatyna. Ich zastosowanie w monoterapii lub w skojarzeniu z innymi lekami (cyclofosfamid, rituksimab) pozwala uzyskać remisję całkowitą u 89% pacjentów [73,74,79,80]. Wieloośrodkowe badania III fazy porównujące skuteczność fludarabiny, chlorambucylu oraz innych schematów wielolekowych wykazały znacznie wyższą skuteczność fludarabiny w zakresie odsetka uzyskiwanych odpowiedzi hematologicznych, oraz remisji całkowitych (OR 72% vs 51%; CR 7% vs 0%). Wykazano także, że skojarzenie fludarabiny, czy też innych analogów puryn, z cyklofosfamidem dodatkowo poprawia wyniki leczenia. Należy jednak podkreślić, że w żadnym z

przeprowadzonych dotychczas badań nie wykazano jednak różnicy w zakresie całkowitego przeżycia chorych z B-CLL [72-74,81,82].

Istotny postęp w leczeniu B-CLL odnotowano po wprowadzeniu do leczenia przeciwciał monoklonalnych [74]. Dwa z nich, rytuksymab (anty-CD20) oraz alemtuzumab (anty-CD52) doczekały się oceny w badaniach klinicznych [73,74]. Okazało się, że zastosowanie rytuksymabu w skojarzeniu z cyklofosfamidem i jednym z analogów puryn (2-CdA lub fludarabina) jest aktualnie najlepszą metodą leczenia 1-linii chorych na B-CLL w dobrym stanie ogólnym [72-74,83-87]. Trzeba jednak pamiętać, że u pacjentów w starszym wieku leczenie terapią skojarzoną za pomocą analogów puryn związane jest z dużym ryzykiem mielosupresji [74,85,88].

Innym przeciwciałem monoklonalnym, które znalazło zastosowanie w terapii B-CLL jest alemtuzumab (anty-CD52). Jego podanie u wcześniej nieleczonych pacjentów z B-CLL prowadzi do odpowiedzi u 85% chorych. W badaniu III fazy CAM307 wykazano, że odsetek odpowiedzi u chorych leczonych alemtuzumabem jest znacznie wyższy niż u pacjentów leczonych chlorambucylem (OR odpowiednio 83% vs 55%, CR 24% vs 2%) [73,74,89]. Niestety, w grupie pacjentów leczonych alemtuzumabem obserwowano dużą częstość rozwoju powikłań infekcyjnych zarówno bakteryjnych jak i wirusowych (w tym reaktywacji infekcji CMV). Późniejsze badania wykazały, że zastosowanie Alemtuzumabu niesie szczególne korzyści w grupie chorych z B-CLL z delecją ramienia krótkiego chromosomu 17 [72,77,90].

W świetle dotychczasowych danych wydaje się, że tylko allogeniczne przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych (allo-HSCT) stwarza możliwość wyleczenia choroby. Z powodu licznych ograniczeń, metoda ta znajduje zastosowanie głównie u młodszych chorych z delecją 17p i opornością na leczenie analogami puryn.

Dużo większym problemem jest leczenie nawrotu B-CLL po skutecznym leczeniu 1-linii. Zgodnie z najnowszymi zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Onkologicznego (ESMO) nawrót przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej po czasie remisji dłuższym niż 12 miesięcy jest wskazaniem do powtórzenia terapii stosowanej w pierwszej linii [74,91]. Jedynie schemat zawierający fludarabinę, cyklofosfamid i rytuksymab nie powinien być powtarzany przed upływem 24 miesięcy ze względu na duże ryzyko oporności i nadmierną toksyczność [74]. W przypadku oporności na analogi puryn stosuje się wysokie dawki metylprednizolonu w monoterapii lub w skojarzeniu z rytuksymabem [74,92-95]. W ostatnim czasie powstało wiele nowych leków, które mogą okazać się potencjalnie skuteczne w leczeniu B-CLL. Są to między innymi nowe przeciwciała

monoklonalne, półsyntetyczne flawony, leki immunomodulujące czy antyangiogenne [74]. W krajach Unii Europejskiej oraz w USA wskazaniem do zastosowania ofatumumabu, humanizowanego przeciwciała skierowanego przeciw antygenowi CD20, jest oporność na analogi puryn i alemtuzumab oraz brak odpowiedzi hematologicznej po leczeniu drugiej i kolejnej linii [74,96,97]. Kolejne nowe przeciwciała znajdujące zastosowanie w leczeniu B-CLL to GA-101 (anty-CD20), lumiliksimumab (anty CD23), HCD122 i SGN-40 (anty-CD40) [74, 98]. Potencjalną skuteczność w leczeniu B-CLL wykazują również immunotoksyny. Są to przeciwciała połączone z czynnikami wzrostu lub toksynami. Należą do nich denileukin diftitox, ludzka interleukina 2 połączona z toksyną błoniczą oraz BL22, immunoglobulina Ig1 połączona z egzotoksyną bakterii *Pseudomonas* skierowana przeciwko antygenowi CD22 [74,98-100]. Bendamustyna, obecna na rynku farmaceutycznym od ponad trzydziestu lat, jest obecnie również stosowana w opornej i nawrotowej B-CLL [74,101]. Pacjenci leczeni schematami zawierającymi bendamustynę uzyskują stosunkowo długi PFS i OS [74,102]. W terapii B-CLL zastosowanie znalazła również briostatyna-1, wykazująca obiecujące działanie w leczeniu postaci opornej i nawrotowej [74]. W badaniach klinicznych oceniano również skuteczność leków immunomodulujących w leczeniu chorych z B-CLL. Jednakże wyniki oceny skuteczności talidomidu nie były obiecujące. Lenalidomid okazał się być mniej toksyczny i wykazał skuteczność w leczeniu opornej i nawrotowej B-CLL. [74,100]. Ostatnio prowadzone są badania kliniczne oceniające skuteczność nowych analogów puryn w leczeniu oporności i nawrotów B-CLL. Należą do nich kłofarabina, nelarabina i forodezyna. Obecnie nie znane są jeszcze wyniki leczenia tymi lekami, jednakże wydają się one być obiecujące [74,103-106].

Należy nadmienić, że dotychczas stosowane metody terapii B-CLL pozwalają na uzyskanie odpowiedzi hematologicznych (zmniejszenie masy węzłowej, organomegalii, poprawa w zakresie cytopenii obwodowej), wydłużenie czasu do progresji choroby (PFS) nie wpływając na wydłużenie całkowitego przeżycia (OS). W indywidualnych przypadkach jednak podjęcie bardzo aktywnych form terapii stwarza szansę na poprawę rokowania. Z tego właśnie powodu poszukuje się wciąż nowych czynników prognostycznych powiązanych z OS.

Próby identyfikacji nowych czynników przepowiadających przebieg choroby u poszczególnych pacjentów z B-CLL są podejmowane od wielu lat. Jak dotąd brano pod uwagę szereg parametrów, powiązanych z aktywnością choroby, w tym stężenie β_2 -mikroglobuliny czy też rozpuszczalnego antygeny CD23 we krwi, aktywność kinazy tymidynowej w komórkach białaczkowych [107-110], ekspresję markera powierzchniowego

CD38 oraz CD49d i wewnątrzcytoplazmatyczną ekspresję ZAP70, [48,111-117], obecność aberracji cytogenetycznych w badaniu FISH, czy też stan mutacyjny regionu zmiennego genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin w komórkach białaczkowych oceniany techniką PCR [36,111,118-120]. Każdy z wymienionych powyżej czynników uznano za niezależny czynnik prognostyczny u chorych z B-CLL. Jednakże z powodu ograniczonej ich dostępności, złożoności metodologicznej oraz wysokich kosztów oznaczeń części z nich nie można zastosować dla potrzeb rutynowej diagnostyki hematologicznej [3,121]. Obszerna analiza przeprowadzona na podstawie 25 lat obserwacji w Centrum Onkologii M.D. Anderson (MDACC, ang. *M.D. Anderson Cancer Center*) w Teksasie pod kierownictwem Wierda i wsp. [122] pozwoliła na wyodrębnienie zmiennych niezależnych o charakterze prognostycznym. Według wymienionych autorów należą do nich: wiek, płeć, stopień zaawansowania klinicznego według Rai, liczba zajętych grup węzłowych (ang. *LNR - number of involved lymph node regions*), bezwzględna liczba limfocytów (ang. *ALC - absolute lymphocyte count*) i stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi. Na ich podstawie opracowano indeks prognostyczny (ang. *prognostic index score*) umożliwiający oszacowanie prawdopodobieństwa przeżycia u chorych z B-CLL. Przydatność wyżej wymienionego systemu prognostycznego potwierdziły badania opublikowane w 2009 roku przez Shanafelt i wsp. w Mayo Clinic Rochester [117,123]. Także późniejsze prace udokumentowały wartość prognostyczną większości z wymienionych czynników oraz ich związek z czasem do włączenia leczenia (ang. *TTT time to treatment*) oraz całkowitym przeżyciem (ang. *OS overall survival*). Ich autorzy nie potwierdzili jednak znaczenia płci i ALC jako niezależnych czynników w przewidywaniu OS u chorych na B-CLL [123].

W wielośrodkowej retrospektywnej analizie jednoparametrycznej przeprowadzonej przez Doubek i wsp. wykazano, że płeć męska, II-IV stopień zaawansowania według klasyfikacji Rai, niezmutowany IgVH, obecność delecji 17p i 11q, ekspresja ZAP70 na $\geq 20\%$ komórek i CD38 na $\geq 30\%$ komórek są istotnie powiązane ze skróceniem OS. Analiza wieloparametryczna obejmująca płeć, wiek, delecję 17p i stan mutacyjny IgVH również potwierdziła związek wymienionych parametrów z OS oraz z czasem do podjęcia terapii (TTT). Analiza jednoczynnikowa wykazała istotnie krótszy TTT u pacjentów z niezmutowanym IgV_H, delecją 17p, 11q, obecnością ekspresji CD38 na $\geq 30\%$ komórek białaczkowych oraz z II-IV stopniem zaawansowania choroby według klasyfikacji Rai [124]. Podobną analizą przeprowadził Tecchio i wsp. w bieżącym roku. Autorzy potwierdzili związek stężenia β_2 -mikroglobuliny, stopnia zaawansowania klinicznego choroby według Rai oraz odsetka komórek z obecnością ekspresji ZAP70, a także nowo

poznane białka z rodziny TNF, tzw. APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) chroniącego komórki B-CLL przed apoptozą z czasem do podjęcia terapii. Co ciekawe, zarówno w analizie jedno- jak i wieloparametrycznej wymienione czynniki te okazały się być powiązane z krótkim TTT [125].

Powszechnie stosowane klasyfikacje oceny stopnia zaawansowania klinicznego B-CLL opracowane przez Rai i wsp. oraz przez Bineta i wsp. umożliwiają przewidywanie TTT i OS. Coraz częściej jednak B-CLL rozpoznaje się we wczesnych stadiach zaawansowania zmian (Rai 0, Binet A), w których stratyfikacja ryzyka na podstawie klasyfikacji zaawansowania choroby niestety zawodzi [117,126]. Z tego powodu nadal trwają badania nad znalezieniem nowych czynników i modeli prognostycznych ułatwiających przewidywanie dalszego przebiegu choroby. Postuluje się, że u chorych o niewielkim zaawansowaniu choroby jednym z takich nowych markerów prognostycznych może być ekspresja dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na komórkach B-CLL [67].

Dipeptydylopeptydaza IV bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, regulacji stężenia hormonów, chemokin i neuropeptydów oraz aktywacji limfocytów T i komórek prezentujących antygen [126-128]. Odgrywa także istotną rolę w procesach komunikacji komórkowej, głównie poprzez współdziałanie z cząsteczkami kolagenu oraz fibronektyny. Uczestniczy również w regulacji wzrostu, adhezji i migracji komórek [70,126]. Z tego powodu ekspresja CD26 na komórkach białaczkowych może mieć istotne znaczenie dla dynamiki przebiegu B-CLL [70,129]. W dostępnej literaturze można znaleźć kilka doniesień na temat roli dipeptydylopeptydazy IV/CD26 w patogenezie nowotworów hematologicznych, w tym przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej. W 1999 roku Bauvois i wsp. stosując metodę dwukolorowej cytofluorometrii przepływową nie wykazali ekspresji CD26 na obwodowych spoczynkowych komórkach linii B ($CD20^+CD23^-$) u osób zdrowych. Potwierdzili oni natomiast ekspresję CD26 na komórkach ($CD20^+CD23^+$) poddanych działaniu IL-4 lub SAC (SAC I: szczep gronkowca złocistego Cowan I- *ang. Staphylococcus aureus strain cowan I*) w warunkach *in vitro* oraz na komórkach B-CLL. Już wówczas wysunęli także hipotezę, że ekspresja CD26 na komórkach B-CLL może mieć znaczenie prognostyczne u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową [56].

Próbie wyjaśnienia roli CD26 w modelu prognostycznym pacjentów z B-CLL podjął Cro i wsp. [60]. Badanie to dotyczyło nie tylko chorych z B-CLL, ale również z innymi chłoniakami linii B, jak FL, MCL, MM, HCL and DLBCL. Jednym z istotnych wniosków tego badania było wykazanie u pacjentów z B-CLL zróżnicowanej ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na komórkach białaczkowych. Wielkość ekspresji CD26

istotnie korelowała z ekspresją CD49d, CD38 i ZAP70, jak również ze stanem mutacyjnym *IgVH* ($p < 0,0001$). Analiza Kaplana-Meiera potwierdziła istotnie krótszy czas do włączenia leczenia (TTT) u chorych, u których wykazano ekspresją CD26 na minimum 10% komórek białaczkowych ($p < 0,0001$). W konkluzji pracy badacze stwierdzili, że ocena ekspresji CD26 może być pomocna w wyodrębnieniu pacjentów z B-CLL o niekorzystnym przebiegu klinicznym choroby, a tym samym w podejmowaniu decyzji dotyczących włączenia terapii przeciwnowotworowej. Dane te stały się przesłanką potwierdzającą rolę dipeptydylopeptydazy IV/CD26 jako nowego markera prognostycznego u chorych z B-CLL [60].

W niniejszej pracy doktorskiej również podjęto próbę oceny związku pomiędzy ekspresją CD26 na komórkach B-CLL, profilem innych, uznanych czynników rokowniczych, a czasem do włączenia leczenia cytoredukcyjnego i całkowitym przeżyciem. Wykazano, że odsetek komórek wykazujących ekspresję CD26 rośnie wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego według klasyfikacji Rai w chwili rozpoznania choroby. Spostrzeżenie to ma charakter oryginalny. Związku takiego nie udało się bowiem potwierdzić w badaniach prowadzonych wcześniej. Badania własne wykazały także związek pomiędzy ekspresją CD26 na komórkach białaczkowych a innymi parametrami laboratoryjnymi o uznanym znaczeniu rokowniczym, takimi jak aktywność LDH i stężenie β_2 -mikroglobuliny. Związku takiego nie udało się potwierdzić w odniesieniu do ekspresji błonowej CD38 i cytoplazmatycznej ZAP70. Dane te, podobnie jak rezultaty otrzymane przez Molica i wsp. oraz Cro i wsp. wydają się sugerować istnienie związku pomiędzy wysokim poziomem ekspresji CD26 na komórkach białaczkowych a niekorzystnym przebiegiem klinicznym B-CLL [60,67].

Do ciekawych wniosków doprowadziła także analiza związku pomiędzy odsetkiem komórek B-CLL wykazujących ekspresję CD26 a TTT oraz OS. Okazało się, że u pacjentów CD26⁻ przeżycie całkowite jest istotnie dłuższe niż u chorych CD26⁺. Spostrzeżenie to znalazło potwierdzenie we wcześniej przeprowadzonych analizach przeprowadzonych przez Cro i wsp. Ocena wyników przeprowadzonych badań własnych wskazuje jednak dodatkowo, że odsetek komórek B-CLL z obecnością ekspresji CD26 różnicuje chorych z progresywną oraz nie-progresywną postacią choroby oraz tych, którzy wymagają rozpoczęcia terapii przed i po 12 miesiącu od rozpoznania. Wykazano bowiem występowanie istotnych różnic w zawartości komórek CD26⁺ we krwi chorych bez i z cechami progresji choroby. Odsetek ten był istotnie wyższy w grupie pacjentów wymagających rozpoczęcia terapii. W badaniach własnych wykazano także, że wartość TTT

była odwrotnie skorelowana z ilością komórek białaczkowych wykazujących ekspresję CD26. W grupie chorych CD26⁺ w porównaniu do CD26⁻ również stężenie β_2 -mikroglobuliny we krwi było istotnie statystycznie wyższe. Wykazano także korelację pomiędzy odsetkiem komórek z obecnością ekspresji CD26 a stopniem zaawansowania klinicznego choroby według Rai. Dane te nie znalazły jak dotąd potwierdzenia w wynikach innych autorów.

Na przestrzeni ostatnich lat przeprowadzono kilka badań, których celem była próba jednoznacznego wyjaśnienia roli i znaczenia ekspresji dipeptydylopeptydazy IV na komórkach białaczkowych u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową. W 2009 roku Molica i wsp. przeanalizowali związek pomiędzy parametrami rokowniczymi o ugruntowanym znaczeniu biologicznym a stężeniem rozpuszczalnej postaci dipeptydylopeptydazy IV/CD26 we krwi u chorych na B-CLL. W analizie ocenie poddano zależność pomiędzy sCCD26 a stopniem klinicznego zaawansowania według klasyfikacji Rai, stanem mutacyjnym regionu zmiennego genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin, aktywnością LDH, stężeniem β_2 -mikroglobuliny oraz odsetkiem komórek białaczkowych z obecnością ekspresji CD38 i ZAP70. W badaniu tym nie potwierdzono związku pomiędzy stężeniem we krwi rozpuszczalnej formy dipeptydylopeptydazy IV/CD26 a okresem klinicznego zaawansowania choroby według klasyfikacji Rai, stanem mutacyjnym *IgVH*, stężeniem β_2 -mikroglobuliny i aktywnością LDH. Autorzy zaobserwowali jedynie słaby związek pomiędzy ekspresją ZAP70 i CD38 na komórkach białaczkowych oraz stężeniem dipeptydylopeptydazy IV/CD26 w surowicy krwi (p odpowiednio 0,07 i 0,08). Zwrócili jednak także uwagę na występowanie istotnych różnic w czasie do rozpoczęcia leczenia (TTT, *ang. time to treatment*) pomiędzy chorymi ze stężeniem CD26 powyżej i poniżej punktu odcięcia (371 ng/ml). Okazało się także, że wraz ze wzrostem stężenia CD26 obserwowano proporcjonalnie częściej odsetek chorych z niezmutowanym *IgVH*, co przepowiadało krótszy TTT. Dane te potwierdziły wstępnie znaczenie prognostyczne CD26 w ocenie dalszego przebiegu choroby, szczególnie dla chorych we wczesnym stadium B-CLL [67].

W ostatnim czasie podjęto szereg prób w celu opracowania modelu prognostycznego ułatwiającego podejmowanie decyzji terapeutycznych u chorych z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową. Wierda i wsp. zaproponowali punktowy system prognostyczny oparty na analizie wieku (1 punkt <50 lat, 2 punkty 50-65 lat, 3 punkty > 65lat), stężenia β_2 -mikroglobuliny (1 punkt 1-2xULN, 2 punkty > 2 x ULN), bezwzględnej liczby limfocytów (ALN, 1 punkt 20-50x10⁹/L, 2 punkty > 50x10⁹/L), płci (1 punkt – płeć męska) oraz zaawansowania klinicznego choroby (1 punkt - III lub IV okres wg Rai) i liczby

zajętych obszarów węzłowych (LNR) (≥ 3 - 1 punkt). Na jego podstawie wyodrębniono trzy grupy ryzyka: niskie (0-3), pośrednie (4-7) oraz wysokie (≥ 8 punktów) [122]. Model ten był wielokrotnie weryfikowany. W 2009 roku Shanafelt i wsp. w Mayo Clinic Rochester potwierdzili wartość prognostyczną większości wymienionych czynników w przewidywaniu TTT oraz całkowitego przeżycia OS [123]. W latach późniejszych model ten doczekał się także krytycznych analiz porównawczych. Bulian i wsp. wykazali, że prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia nie różni się pomiędzy tak zdefiniowanymi grupami ryzyka. Szczegółowa analiza wykazała jednak, że względne prawdopodobieństwo zgonu jest wyższe w grupie chorych wysokiego ryzyka. Podobnie, czas do włączenia terapii okazał się być istotnie krótszy w grupie wysokiego ryzyka [117]. Analiza porównawcza wykazała, że oba wymienione systemy prognostyczne skutecznie identyfikują pacjentów we wczesnych stadiach zaawansowania klinicznego B-CLL o wysokim prawdopodobieństwie długiego całkowitego przeżycia (OS) oraz długim czasie do podjęcia terapii (TTT). Niezależnie, Bulian i wsp. zaproponowali własny, nowy system rokowniczy oparty o analizę podobnych parametrów kliniczno-laboratoryjnych, uwzględniający jednak okres zaawansowania choroby według klasyfikacji Binet'a a nie Rai'a [117, 130]. W tak sformułowanym wieloczynnikowym modelu prognostycznym ALC jak i LNR nie okazały się jednak być istotnie statystycznie różne w poszczególnych grupach rokowniczych. Z tego powodu opracowano model czteroparametryczny uwzględniający wiek, płeć, stadium Binet'a i stężenie β_2 -mikroglobuliny dla potrzeb przewidywania dalszego przebiegu choroby u pacjentów z B-CLL. Siłę prognostyczną tak opracowanego modelu porównano z oryginalnym sześcioparametrycznym modelem Wierdy i wsp. [117,122]. Analiza ta wypadła korzystnie, co według autorów pracy pozwala na jego powszechne zastosowanie w ocenie prawdopodobieństwa całkowitego przeżycia OS oraz przewidywanego czasu do podjęcia terapii u chorych z B-CLL [117].

W niniejszej pracy także podjęto próbę opracowania modelu prognostycznego umożliwiającego podejmowanie właściwych decyzji terapeutycznych u pacjentów z rozpoznaniem przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej. Uwzględniono profil uznanych czynników o znaczeniu prognostycznym (ekspresja ZAP70, CD38, stężenie β_2 -mikroglobuliny, aktywność LDH oraz stopień zaawansowania klinicznego według klasyfikacji Rai) a także ilość we krwi obwodowej komórek z ekspresją CD26. W wyniku przeprowadzonych analiz opracowano model własny pozwalający na wyodrębnienie dwóch grup rokowniczych. I tak, grupę o korzystnym rokowaniu charakteryzował niski odsetek komórek z obecnością ekspresji ZAP70, CD38 i CD26, prawidłowa aktywność LDH, niskie

stężenie β_2 -mikroglobuliny i niski stopień zaawansowania według Rai. Przeciwnie, grupę o niekorzystnym rokowaniu cechował odmienny profil badanych czynników rokowniczych. Co więcej, opracowany model pozwalał także na różnicowanie pomiędzy wymienionymi grupami pacjentów o korzystnym i niekorzystnym rokowaniu w oparciu o inne istotne parametry laboratoryjne, w tym liczbę leukocytów (G/l), liczbę limfocytów (G/l) oraz stężenie hemoglobiny (mmol/l) we krwi obwodowej w chwili rozpoznania B-CLL. W korzystnej grupie rokowniczej obserwowano bowiem istotnie niższą liczbę leukocytów oraz limfocytów, a także wyższe stężenie hemoglobiny we krwi w porównaniu z osobami z grupy o niekorzystnym rokowaniu. W opinii autora niniejszej pracy opracowany model może znaleźć szerokie zastosowanie praktyczne.

VI WNIOSKI

1. Ekspresja antygenu CD26 na $\geq 10\%$ komórek CD5⁺CD19⁺CD23⁺ jest powiązana ze skróceniem całkowitego przeżycia u chorych z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową
2. Chorzy z obecną ekspresją CD26 na $\geq 10\%$ komórek o immunofenotypie CD5⁺CD19⁺CD23⁺ szybciej wymagają wdrożenia leczenia cytostatycznego
3. Potwierdzeniem znaczenia prognostycznego ekspresji CD26 na komórkach białaczkowych u chorych z B-CLL jest wykazanie jego związku z uznanymi czynnikami rokowniczymi (stopień zaawansowania według Rai, aktywność LDH w surowicy krwi, stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi)

VII ANEKS

VII.1 Wykaz skrótów

ADA	ang. Adenosine Deaminase (<i>pol. deaminaza adenozyiny</i>)
ADAbp	ang. Adenosine Deaminase Binding Protein (<i>pol. Białko wiążące deaminazę adenozyiny</i>)
ADP	ang. adenosine diphosphate (<i>pol. adenozyino-5'-difosforan</i>)
ALA	ang. Alanine (<i>pol. alanina</i>)
ALC	ang. Absolute Lymphocyte Count (<i>pol. bezwzględna liczba limfocytów</i>)
ASP	ang. asparaginase (<i>pol. Asparaginaza</i>)
ATM	ang. Ataxia Teleangiectasia Mutated (<i>pol. Kinaza ATM</i>)
B-CLL	ang. B-cell chronic lymphocytic leukemia (<i>pol. Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa</i>)
BNP	ang. Brain Natriuretic Peptyd (<i>pol. mózgowy peptyd natriuretyczny</i>)
Ca	ang. Calcium (<i>pol. jony wapnia</i>)
CD	ang. Cluster of Differentiation (<i>pol. antygen różnicowania komórkowego</i>)
CR	ang. complete remission (<i>pol. remisja całkowita</i>)
CREB1	ang. cAMP response element-binding type-1 (<i>pol. białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP typu-1</i>)
CREB2	ang. cAMP response element-binding type-2 (<i>pol. białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP typu-2</i>)

DAPI	ang. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (<i>pol. 4',6-diamidyno-2-fenylindol</i>)
DASH	ang. „dipeptydyl peptidase-IV activity and/or structure homologous (<i>pol. molekuly o homologicznej strukturze i aktywnosci dipeptydylopeptydazy IV/CD26</i>)
DDP4	ang. Dipeptidyl-Peptidase 4 (<i>pol. dipeptydylopeptydaza IV</i>)
DLBCL	ang. diffused large B-cell lymphoma (<i>pol. chłoniak z dużych rozlanych komórek B</i>)
ECM	ang. ExtraCellular Matrix (<i>pol. macierz zewnątrzkomórkowa</i>)
EDTA	ang. Ethylendiaminetetraacetic Acid (<i>pol. kwas etylenodiaminotetraoctowy</i>)
FBS	ang. Fetal Bovine Serum (<i>pol. wołowa surowica płodowa</i>)
FISH	ang. Flourescence In Situ Hybridisation (<i>pol. flourescencyjna hybrydyzacja in situ</i>)
FITC	ang. Fluorescein isothiocyanate (<i>pol. izotiocyjanian fluoresceiny</i>)
FL	ang. follicular lymphoma (<i>pol. chłoniak grudkowy</i>)
GLP 1,2	ang. glucagon-like peptide 1,2 (<i>pol. peptyd glukagonopodobny 1,2</i>)
G-CSF	ang. Granulocytes Colony Stimulating Factor (<i>pol. czynnik stymulujący kolonie granulocytów</i>)
GEP	ang. Gene Expressing Profile (<i>pol. profil ekspresji genu</i>)
GIP	ang. Gastric Inhibitory Peptide (<i>pol. żołądkowy peptyd hamujący</i>)
GLP-1 ,2	ang. glucagon-like peptide 1,2 (<i>pol. peptyd glukagonopodobny</i>)
GM-CSF	ang. Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor (<i>pol. czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów</i>)

GRP	ang. Gastrin Releasing Peptide (<i>pol. peptyd uwalniający gastrynę</i>)
H ⁺	ang. Hydrogen (<i>pol. jony wodoru</i>)
Hb	ang. Haemoglobin (<i>pol. Hemoglobina</i>)
HCL	ang. Hairy-cell leukemia (<i>pol. białaczka włochatokomórkowa</i>)
His	ang. Histidin (<i>pol. Histydyna</i>)
HIV	ang. Human Immunodeficiency Virus (<i>pol. ludzki wirus upośledzenia odporności</i>)
IgD	ang. Immunoglobulin D (<i>pol. Immunoglobulina D</i>)
IgG	ang. Immunoglobulin G (<i>pol. Immunoglobulina G</i>)
IgM	ang. Immunoglobulina M (<i>pol. Immunoglobulina M</i>)
IgV _H	ang. Immunoglobulin Heavy chain variable Region (<i>pol. stan mutacyjny genu łańcucha ciężkiego immunoglobuliny</i>)
IL	ang. Interleukin (<i>pol. Interleukina</i>)
LDH	ang. Lactic Dehydrogenase (<i>pol. dehydrogenaza kwasu mlekowego</i>)
LNR	ang. Lymph Node Ratio (<i>pol. Liczba zajętych regionów węzłowych</i>)
MCL	ang. mantle cell lymphoma (<i>pol. chłoniak z komórek płaszczka</i>)
Me	ang. Median (<i>pol. Mediana</i>)
Mg	ang. Magnesium (<i>pol. jony magnezu</i>)

MM	ang. myeloma multiplex (<i>pol. szpiczak mnogi</i>)
NAD ⁺ , NADH	ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide (<i>pol. dinukleotyd nikotynamidoadeninowy</i>)
NK	ang. Natural Killer (<i>pol. Komórki NK</i>)
NPY	ang. Neuropeptide Y (<i>pol. neuropeptyd Y</i>)
OR	Ang. Overall Response (<i>pol. Odpowiedź całkowita</i>)
OS	ang. Overall Survival (<i>pol. całkowite przeżycie</i>)
PACAP	ang. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (<i>pol. polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową</i>)
PBS	(<i>pol. zbuforowany roztwór soli fizjologicznej bez jonów Ca i Mg</i>)
PFS	ang. progression-free survival (<i>pol czas do progresji choroby</i>)
PYY	ang. Peptide YY (<i>pol. peptyd YY</i>)
Pt	ang. Platelets (<i>pol. płytki krwi</i>)
Q ₁	ang. Quartile 1 (<i>pol. kwartył 1</i>)
Q ₂	ang. Quartile 2 (<i>pol. kwartył 2</i>)
Q ₃	ang. Quartile 3 (<i>pol. kwartył 3</i>)
Q ₄	ang. Quartile 4 (<i>pol. kwartył 4</i>)
SD	ang. Standard Deviation (<i>pol. odchylenie standardowe</i>)
Ser	ang. Serie (<i>pol. seryna</i>)

SSC	dwuwodny cytrynian sodu ($\text{NaCl} + \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
TK	ang. Tyrosine Kinase (<i>pol. kinaza tyrozynowa</i>)
TNF	ang. Alfa Tumor Necrosis Factor (<i>pol. czynnik martwicy nowotworu alfa</i>)
TPA	ang. Phorbol 12-myristate 13-Acetate (<i>pol. Mirystynian forbolu 12-13-octanowy</i>)
TTT	ang. Time To Treatment (<i>pol. czas do włączenia leczenia</i>)
VIP	(ang. vasoactive intestinal peptide) (<i>pol. wazoaktywny peptyd jelitowy</i>)
ULN	ang. Upper Limits of Normal (<i>pol. powyżej górnej granicy normy</i>)
\bar{x}	ang. arithmetic average (<i>pol. średnia arytmetyczna</i>)
ZAP70	ang. zeta-chain-associated protein kinase 70 (<i>pol. białko ZAP70</i>)

VII.2 Wykaz tabel

Tabela 1. Klasyfikacja zaawansowania klinicznego przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej wg Rai i wsp.....	14
Tabela 2. Klasyfikacja zaawansowania klinicznego przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej według Bineta	15
Tabela 3. Zidentyfikowane niezależne czynniki przepowiadające dalszy przebieg procesu chorobowego u pacjentów na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową [24]	21
Tabela 4. Peptydy będące substratem dla dipeptydylopeptydazy IV/CD 26 [65].....	26
Tabela 5. Charakterystyka wieku osób badanych w chwili rozpoznania choroby z uwzględnieniem płci (n – liczba badanych osób)	32
Tabela 6. Zestawienie podstawowych danych dotyczących populacji badanej, ich czasu obserwacji oraz czasu do podjęcia leczenia	36
Tabela 7. Charakterystyka badanej grupy chorych w chwili rozpoznania B-CLL (n = 162). Podstawowe dane laboratoryjne	37
Tabela 8. Charakterystyka badanej grupy chorych z B-CLL w chwili rozpoznania choroby. Inne dane laboratoryjne	46
Tabela 9. Ocena związku pomiędzy odsetkiem komórek CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ z obecnością CD26 a innymi uznanymi czynnikami rokowniczymi.....	68
Tabela 10. Wyniki analizy wariancji przeprowadzonej w obszarze zmiennych rokowniczych u pacjentów z B-CLL	81
Tabela 11. Zróżnicowanie parametrów laboratoryjnych pomiędzy grupami u pacjentów z B-CLL o rokowaniu korzystnym i niekorzystnym	82
Tabela 12. Śmiertelność w grupie chorych z B-CLL z TTT < i ≥ 12 miesięcy od rozpoznania	104
Tabela 13. Analiza zależności pomiędzy ekspresją CD26 na komórkach CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD23 ⁺ i wybranymi parametrami klinicznymi oraz laboratoryjnymi u ocenianych chorych z B-CLL	105
Tabela 14. Wzajemne zależności pomiędzy wybranymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi u ocenianych pacjentów z B-CLL	106
Tabela 15. Zróżnicowanie parametrów cytogenetycznych (delecja 11q22-23) u chorych CD26 ⁻ i CD26 ⁺	106
Tabela 16. Zróżnicowanie parametrów cytogenetycznych (delecja 17p13) u chorych CD26 ⁻ i CD26 ⁺	106
Tabela 17. Zróżnicowanie parametrów cytogenetycznych (delecja 13q14.3) u chorych CD26 ⁻ i CD26 ⁺	107
Tabela 18. Stężenie β ₂ -mikroglobuliny u pacjentów z obecnością i brakiem ekspresji CD26 na komórkach białaczkowych	107
Tabela 19. Zróżnicowanie stopnia zaawansowania klinicznego według Rai w zależności od czasu do podjęcia terapii (TTT)	107
Tabela 20. Czas do podjęcia terapii (TTT) a ekspresja CD26 na komórkach B-CLL	108
Tabela 21. Aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) w surowicy krwi a czas do podjęcia terapii (TTT) w ocenianej grupie chorych z B-CLL.....	108
Tabela 22. Ekspresja CD38 na komórkach białaczkowych a czas do podjęcia terapii (TTT) w ocenianej grupie chorych z B-CLL	108
Tabela 23. Ekspresja ZAP70 na komórkach białaczkowych a czas do podjęcia leczenia (TTT) w ocenianej grupie chorych z B-CLL	108
Tabela 24. Stężenie β ₂ -mikroglobuliny w surowicy krwi a czas do podjęcia terapii (TTT) w ocenianej grupie chorych z B-CLL	109

Tabela 25. Zróżnicowanie wybranych parametrów laboratoryjnych i klinicznych u chorych z B-CLL w poszczególnych stadiach zaawansowania klinicznego według Rai.....	109
Tabela 26. Zróżnicowanie stopnia zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai w zależności od odsetka komórek CD38 ⁺ i CD38 ⁻ w badanej grupie chorych z B-CLL	110

VII.3 Wykaz rycin

Rycina 1. Typowy obraz mikroskopowy rozmazu krwi obwodowej pacjenta z B-CLL. Barwienie H+E. Powiększenie 400x.....	12
Rycina 2. Typowy obraz mikroskopowy rozmazu szpiku kostnego pacjenta z B-CLL. Barwienie H+E. Powiększenie 400x.....	13
Rycina 3. Lokalizacja genu <i>DPP4</i> oraz genów w chromosomie 2 (2q24.3).....	23
Rycina 4. Wiek osób badanych w chwili rozpoznania choroby z uwzględnieniem płci.....	33
Rycina 5. Częstość zachorowań w poszczególnych przedziałach wieku w zależności od płci badanych pacjentów (A).....	33
Rycina 6. Częstość zachorowań w poszczególnych przedziałach wieku w zależności od płci badanych pacjentów (B).....	34
Rycina 7. Stopień zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai w grupie osób poddanych ocenie (n = 162).....	35
Rycina 8. Przebieg reakcji utleniania L-mleczanu przez dehydrogenazę mleczanową w obecności NADH.....	41
Rycina 9. Odsetek komórek białaczkowych CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD23 ⁺ wykazujących ekspresję antygeny CD38 na swojej powierzchni w ocenie cytofluorometrycznej (analiza w ośmiokolorowym cytometrze przepływowym firmy Becton-Dickinson Canto II).....	47
Rycina 10. Ocena obecności antygeny CD38 metodą cytofluorometrii przepływowej na limfocytach CD19 ⁺ krwi obwodowej w przypadku przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej.....	47
Rycina 11. Odsetek komórek białaczkowych CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD23 ⁺ wykazujących i nie wykazujących ekspresji ZAP70 w ocenie cytofluorometrycznej.....	49
Rycina 12. Błonowo-cytoplazmatyczna ekspresja ZAP-70 w komórkach B-CLL krwi obwodowej oceniana metodą fluorocytometrii przepływowej (aparat Canto II, Becton-Dickinson).....	50
Rycina 13. Odsetek komórek białaczkowych CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD23 ⁺ wykazujących ekspresję CD26 w ocenie cytofluorometrycznej (analiza w ośmiokolorowym cytofluorometrze przepływowym Canto II, Becton-Dickinson).....	51
Rycina 14. Ocena ekspresji CD26 w komórkach B-CLL krwi obwodowej w cytofluorometrze ośmiokolorowym Canto II.....	52
Rycina 15. Aktywność LDH w surowicy krwi ocenianych chorych z B-CLL.....	54
Rycina 16. Stężenie β ₂ -mikroglobuliny w surowicy krwi badanych chorych z B-CLL.....	55
Rycina 17. Badanie w kierunku obecności delecji locus 13q14 i 13q34 (D13S319) w jądrach interfazowych komórek B-CLL. Ocena techniką FISH z zastosowaniem trzykolorowej sondy delecyjnej 13q14-34, CEP12.....	56
Rycina 18. Badanie w kierunku obecności delecji 11q22-23 (gen ATM) oraz delecji 17p.13 (gen p53). Analiza techniką FISH z zastosowaniem sond delecyjnych ATM oraz p53.....	58
Rycina 19. Związek ekspresji CD26 (%) na limfocytach białaczkowych z okresem.....	60
Rycina 20. Mediana ekspresji CD26 (%) na limfocytach białaczkowych w zależności od okresu zaawansowania klinicznego B-CLL według klasyfikacji Rai (0+I, II, III+IV).....	61

Rycina 21. Związek ekspresji antygenu CD26 na powierzchni komórek B-CLL (CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD23 ⁺) z aktywnością dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) w surowicy krwi chorych z B-CLL	62
Rycina 22. Mediana ekspresji CD26 (%) na limfocytach białaczkowych w zależności od aktywności dehydrogenazy kwasu mlekowego (U/l).....	63
Rycina 23. Związek ekspresji antygenu CD26 na powierzchni komórek B-CLL (CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD23 ⁺) ze stężeniem β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi chorych z B-CLL...	64
Rycina 24. Mediana ekspresji CD26 (%) na limfocytach białaczkowych w zależności od stężenia β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi chorych z B-CLL	65
Rycina 25. Związek ekspresji antygenu CD26 na powierzchni komórek białaczkowych B-CLL (CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD23 ⁺) z ekspresją cytoplazmatyczną ZAP70 u chorych z B-CLL	66
Rycina 26. Mediana ekspresji CD26 (%) w zależności od ekspresji ZAP70 w komórkach białaczkowych u chorych z B-CLL.....	67
Rycina 27. Zmienność ekspresji antygenu CD26 na powierzchni komórek CD5 ⁺ CD19 ⁺ CD23 ⁺ w zależności od postaci klinicznej B-CLL (postać progresywna wymagająca rozpoczęcia terapii vs postać nie progresywna nie wymagająca leczenia)	69
Rycina 28. Prawdopodobieństwo przeżycia całkowitego (OS) dla całej grupy badanej	71
Rycina 29. Prawdopodobieństwo włączenia leczenia cytostatycznego u chorych z B-CLL w poszczególnych miesiącach od rozpoznania schorzenia (czas do włączenia leczenia 1-171 miesięcy, n=113)	72
Rycina 30. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia (OS) i czasu do podjęcia leczenia (TTT) w badanej grupie pacjentów z B-CLL – analiza Kaplana-Meiera	73
Rycina 31. Analiza Kaplana-Meiera prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego dla pacjentów wymagających i niewymagających rozpoczęcia leczenia cytostatycznego w trakcie trwania okresu aktywnej obserwacji	74
Rycina 32. Analiza Kaplana-Meiera prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego dla pacjentów CD26 ⁻ i CD26 ⁺	75
Rycina 33. Prawdopodobieństwo przeżycia całkowitego dla pacjentów w poszczególnych stadiach zaawansowania klinicznego przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej według klasyfikacji Rai (w chwili rozpoznania choroby) – analiza Kaplana-Meiera	76
Rycina 34. Analiza Kaplana-Meiera prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego dla pacjentów wymagających leczenia przed i po upływie 12 miesięcy od rozpoznania choroby	77
Rycina 35. Dendrogram przedstawiający powiązania pomiędzy zmiennymi (czynnikami rokowniczymi) tworzącymi nowe grupy rokownicze pacjentów z B-CLL	79
Rycina 36. Przedstawienie wartości średnich analizowanych parametrów w hipotetycznych grupach rokowniczych	80
Rycina 37. Zależność pomiędzy okresem zaawansowania klinicznego B-CLL według klasyfikacji Rai a odsetkiem komórek CD26 ⁺	83

Tabela 12. Śmiertelność w grupie chorych z B_CLL z TTT < i ≥ 12 miesięcy od rozpoznania

	Śmiertelność		χ^2
	Żyją	Zgony	Wartość p
TTT<12	50 96,15%	2 3,85%	3,08
TTT≥12	52 86,67%	8 13,33%	0,0791 ^{ns}

Tabela 13. Analiza zależności pomiędzy ekspresją CD26 na komórkach CD5⁺CD19⁺CD23⁺ i wybranymi parametrami klinicznymi oraz laboratoryjnymi u ocenianych chorych z B-CLL

Parametr		Liczba analizowanych osób	Ekspresja CD26 (%)		Wartość p (post-hoc)
			$\bar{x} \pm SD$ (min ; max)	Me \pm SE (Q1 ;Q3)	
Rai	0+I	60	6,19 \pm 11,645 (0 ; 56,2)	0,6 \pm 1,503 (0,04 ; 7,2)	0,0063** (0+IvsII*, p=0,0423* ; 0+Ivs III+IV*, p=0,0383*)
	II	21	21 \pm 26,03 (0 ; 90,7)	6,3 \pm 5,68 (0,5 ; 41,31)	
	III+IV	13	16,51 \pm 16,616 (0 ; 45,5)	8 \pm 4,608 (2,7 ; 33,3)	
LDH (U/l)	w zakresie normy 100-248)	62	8,26 \pm 15,08 (0 ; 55,3)	0,6 \pm 1,915 (0,05 ; 8,7)	0,0069**
	powyżej normy	27	17,64 \pm 22,258 (0 ; 90,7)	7,93 \pm 4,284 (0,8 ; 32,2)	
β 2-mikroglobulina (μ g/l)	<3 000	65	8,61 \pm 15,106 (0 ; 56,24)	0,8 \pm 1,874 (0,1 ; 8,7)	0,04618*
	\geq 3 000	20	20,40 \pm 23,852 (0 ; 90,66)	15,56 \pm 5,334 (0,5 ; 33,6)	
Ekspresja ZAP70 (%)	ZAP70 < 20%	21	10,14 \pm 23,599 (0 ; 90,7)	0,4 \pm 5,15 (0 ; 2,6)	0,0584 ^{ns}
	ZAP70 \geq 20%	45	12,29 \pm 16,05 (0 ; 55,3)	5,39 \pm 2,393 (0,2 ; 18,65)	
Ekspresja CD38 (%)	CD38 < 30%	79	9,54 \pm 15,488 (0 ; 56,2)	0,8 \pm 1,743 (0,05 ; 14,1)	0,0912 ^{ns}
	CD38 \geq 30%	10	22,71 \pm 29,447 (0 ; 90,7)	8,31 \pm 9,312 (0,8 ; 32,2)	
Płeć	kobiety	44	9,21 \pm 14,375 (0 ; 48,2)	0,9 \pm 2,167 (0,08 ; 13,33)	0,7189 ^{ns}
	Mężczyźni	50	12,44 \pm 20,011 (0 ; 90,7)	2,15 \pm 2,83 (0,1 ; 16,65)	
Leczenie	Nieleczony	34	6,75 \pm 13,995 (0 ; 56,2)	0,2 \pm 2,4 (0 ; 3,4)	0,0018**
	leczony	60	13,29 \pm 19,026 (0 ; 90,7)	4,1 \pm 2,456 (0,55 ; 18,33)	
TTT (m-c)	<12	30	19,45 \pm 23,293 (0 ; 90,66)	7,97 \pm 4,253 (0,8 ; 33,8)	0,0812 ^{ns}
	\geq 12	29	7,39 \pm 10,858 (0 ; 41,31)	2,4 \pm 2,016 (0,4 ; 8,7)	
Śmiertelność	Żyją	152	11,20 \pm 17,909 (0 ; 90,66)	1,05 \pm 1,888 (0,1 ; 14,6)	0,3213 ^{ns}
	Zgon	10	4,86 \pm 4,143 (0,1 ; 8,7)	5,32 \pm 2,072 (1,4 ; 8,315)	

Tabela 14. Wzajemne zależności pomiędzy wybranymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi u ocenianych pacjentów z B-CLL

Parametry	r (p)	CD26 (%)	Rai	LDH (U/l)	β2- mikroglobulina (μg/l)	ZAP70 (%)
Rai	r (p)	0,24 (0,0227*)				
LDH (U/l)	r (p)	0,14 (0,2067 ^{ns})	0,32 (0,0005**)			
β2-mikroglobulina (μg/l)	r (p)	0,32 (0,0030**)	-20 (0,0320*)	0,12 (0,1991 ^{ns})		
ZAP70 (%)	r (p)	0,15 (0,2345 ^{ns})	-0,22 (0,0337*)	0,07 (0,4861 ^{ns})	0,20 (0,0861 ^{ns})	

Objaśnienie: r – współczynnik korelacji
p – poziom istotności statystycznej

Tabela 15. Zróżnicowanie parametrów cytogenetycznych (delecja 11q22-23) u chorych CD26⁻ i CD26⁺

delecja ATM (11q22-23) (%)	Ekspresja CD26		χ ² Wartość p
	CD26 ⁻	CD26 ⁺	
Obecna w <10% analizowanych metafaz	16 61,54%	10 38,46%	0,01
Obecna w ≥10% analizowanych metafaz	3 60,00%	2 40,00%	0,9484 ^{ns}

Tabela 16. Zróżnicowanie parametrów cytogenetycznych (delecja 17p13) u chorych CD26⁻ i CD26⁺

Delecja p53 (17p13) (%)	Ekspresja CD26		χ ² Wartość p
	CD26 ⁻	CD26 ⁺	
obecna w <10% analizowanych metafaz	18 62,07%	11 37,93%	0,99
obecna w ≥10% analizowanych metafaz	5 83,33%	1 16,67%	0,3179 ^{ns}

Tabela 17. Zróżnicowanie parametrów cytogenetycznych (delecja 13q14.3) u chorych CD26⁻ i CD26⁺

delecja locus 13q14.3 (D13S319) (%)	Ekspresja CD26		χ^2 Wartość p
	CD26 ⁻	CD26 ⁺	
obecna w ≥10% analizowanych metafaz	12 70,59%	5 29,41%	0,29
obecna w <10% analizowanych metafaz	8 80,00%	2 20,00%	0,5900 ^{ns}

Tabela 18. Stężenie β_2 -mikroglobuliny u pacjentów z obecnością i brakiem ekspresji CD26 na komórkach białaczkowych

Parametr	Liczność	β_2 -mikroglobulina ($\mu\text{g/l}$)		Wartość p
		$\bar{x} \pm \text{SD}$ (min ; max)	Me \pm SE (Q1 ;Q3)	
ekspresja CD26 (%)	CD26 ⁻	59	2134,75 \pm 1161,034 (1034,3 ; 8108,8)	0,0040**
	CD26 ⁺	26	2767,58 \pm 1232,326 (1267,6 ; 6369,8)	

Objaśnienia: Me – mediana

Q1,Q3 – kwartył 1 i 3

SD – odchylenie standardowe

\bar{x} – średnia arytmetyczna

Tabela 19. Zróżnicowanie stopnia zaawansowania klinicznego według Rai w zależności od czasu do podjęcia terapii (TTT)

	Stadium wg klasyfikacji Rai			χ^2 Wartość p
	0+I	II	III+IV	
TTT<12	7 11,67%	23 38,33%	30 50,00%	48,05
TTT≥12	36 69,23%	16 30,77%	0 0,00%	0,0000**

Tabela 20. Czas do podjęcia terapii (TTT) a ekspresja CD26 na komórkach B-CLL

	CD26		χ^2
	<10%	\geq 10%	Wartość p
TTT<12	16 53,33%	14 46,67%	4,44
TTT \geq 12	23 79,31%	6 20,69%	0,0351*

Tabela 21. Aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) w surowicy krwi a czas do podjęcia terapii (TTT) w ocenianej grupie chorych z B-CLL

	LDH		χ^2
	Prawidłowy	Podwyższony	Wartość p
TTT<12	22 37,93%	36 62,07%	5,32
TTT \geq 12	29 60,42%	19 39,58%	0,0211*

Tabela 22. Ekspresja CD38 na komórkach białaczkowych a czas do podjęcia terapii (TTT) w ocenianej grupie chorych z B-CLL

Miesiące	CD38		χ^2
	CD38 ⁻	CD38 ⁺	Wartość p
TTT<12	40 74,07%	14 25,93%	0,18
TTT \geq 12	35 77,78%	10 22,22%	0,6685 ^{ns}

Tabela 23. Ekspresja ZAP70 na komórkach białaczkowych a czas do podjęcia leczenia (TTT) w ocenianej grupie chorych z B-CLL

	ZAP70		χ^2
	ZAP70 ⁻	ZAP70 ⁺	Wartość p
TTT<12	6 17,65%	28 82,35%	0,25
TTT \geq 12	7 22,58%	24 77,42%	0,0619 ^{ns}

Tabela 24. Stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi a czas do podjęcia terapii (TTT) w ocenianej grupie chorych z B-CLL

	β_2 -mikroglobulina		χ^2 Wartość p
	<3000	podwyższony	
TTT<12	24 60,00%	16 40,00%	0,10 0,7505 ^{ns}
TTT \geq 12	21 63,64%	12 36,36%	

Tabela 25. Zróżnicowanie wybranych parametrów laboratoryjnych i klinicznych u chorych z B-CLL w poszczególnych stadiach zaawansowania klinicznego według Rai

Mediana	Stadium wg Rai			Wartość p
	0+I	II	III+IV	
CD38 (%)	1,6	8,6	9,4	0,0003** 16,2009
ZAP70 (%)	27	50	57,5	0,0039** 11,0995
LDH (U/l)	176,5	243,0	274,0	0,0000** 25,1385
β_2 -mikroglobulina (ug/l)	1851,6	2496,0	2499,2	0,0213** 7,7026
TTT (m-ce)	25	7	1	0,0000** 58,7255
Leukocyty (G/l)	21,25	40,10	74,00	0,0006** 14,8857
Limfocyty (G/l)	15,83	28,87	77,21	0,0145** 8,4689

Tabela 26. Zróżnicowanie stopnia zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai w zależności od odsetka komórek CD38⁺ i CD38⁻ w badanej grupie chorych z B-CLL

	Stadium wg Rai			χ^2
	0+I	II	III+IV	Wartość p
CD38 ⁻ (%)	62	21	16	0.2387
CD38 ⁺ (%)	28	44	28	0,00371**

VIII PIŚMIENICTWO

- 1 Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF i wsp. Chronic Lymphocytic Leukemia. American Society of Hematology. Hematology 2002;193-213.
- 2 Dmoszyńska A, Robak T. Podstawy hematologii. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2008, wyd.2
- 3 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G i wsp. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. 2008;111:5446-5456.
- 4 Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A i wsp. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. J Clin Oncol. 2009;27:1637-1643. Epub 2009 Feb 17.
- 5 Hamblin TJ. CLL, how many diseases? Hematol J 2003;4 (suppl.3):183-186.
- 6 Rai KR, Chiorazzi N. Determining the clinical course and outcome in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2003;348:1797-1799.
- 7 Bosch F, Villamor N. ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: a new parameter for an old disease. Hematologica 2003;88:724-726.
- 8 Brugiattelli M, Mannina D, Neri S i wsp. Recent update of prognosis and staging of chronic lymphocytic leukemia. Hematol 2003;88 (suppl.10):30-31.
- 9 Polliack A. Current therapeutic options for subgroups of chronic lymphocytic leukemia. Planning risk-adapted treatment according to recognized prognostic factors. Hematologica 2003;88 (suppl.10):32-35.
- 10 Tait DS. Predicting clinical outcome in CLL: how and why. Hematology 2009;421-429.
- 11 Lewandowski K, Matuszak M. Czynniki prognostyczne w przewlekłej białaczce limfatycznej B-komórkowej. Współczesna Onkologia 2003;7:470-475.
- 12 Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From Pathogenesis to Treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia. Nat Rev Cancer. 2010;10:37-50.
- 13 Gribben JG. How I treat CLL up front. Blood. 2010 Jan 14;115:187-197. Epub 2009 Oct 22.
- 14 Juszczyński P, Warzocha K. Biologia i klinika przewlekłej białaczki limfatycznej. Onkol. Pol. 2001;4:77-84.

- 15 Hansen MM. Chronic lymphocytic leukemia: clinical studies based on 189 cases followed for a long time. *Scand Haematol* 1973; (Suppl.18):1-286.
- 16 Sgambati MT, Linet MS, Devesa SS. Chronic lymphocytic leukemia: epidemiological, familial, and generic aspects. In: Cheson BD, editor. *Chronic lymphoid leukemia; second edition revised and expanded*. New York: Marcel Dekker Inc.: 1991:33-62.
- 17 Cartwright RA, Alexander FE, Mc Kinney PA, Ricketts TJ. *Leukaemia and lymphoma: an atlas of distribution within areas of England and Wales 1984 - 1988*. London: Leukemia Research Fund 1990.
- 18 Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, Evans PA, O'Connor SJ, Richards SJ, Morgan GJ, Jack AS, Hillmen P. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*. 2002;100:635-639.
- 19 Parker TL. Chronic Lymphocytic Leukemia: Prognostic Factors and Impact on Treatment. *Discov Med* 2011;11:115-123.
- 20 Pluta A, Dudziński M, Gutkowski K, Pluta A. Białaczka limfatyczna B-komórkowa: rokowanie i leczenie z uwzględnieniem grupy młodych chorych. *Acta Haematol Pol* 2002;33,1:19-28.
- 21 Abbott BL. Advances in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2004;2:448-454.
- 22 Batycka-Baran A, Baran W, Dzietczenia J, Mazur G. Effective treatment of leukemia cutis with combination of rituximab, cladribine, and cyclophosphamide in patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*. 2010 Oct 27.
- 23 Warzocha K. Optymalizacja strategii leczenia pierwszej linii przewlekłej białaczki limfocytowej. *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 2007;3:78-86.
- 24 Monserrat E, Gine E, Bosch F. Redefining prognostic elements in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol J* 2003; 4 (suppl. 3): 180-182.
- 25 Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF i wsp. Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Society of Hematology. Hematology* 2002;193-213.
- 26 Robak T. The search for optimal treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol Pol* 2003;34 (suppl.1):1-11.
- 27 Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987;69:929-936.
- 28 Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P. Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol*. 1989;81:181-185.

- 29 Berrebi A, Bassousa L, Haran M. The significance of elevated beta 2-microglobulin (b2-m) in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Evidence of in vitro secretion following activation of CLL cells *Leuk Res.* 2010;34:248-249.
- 30 Mazur G, Wróbel T, Sowińska E, Bilińska M, Zagocka E, Kuliczkowski K. Stężenie β_2 -mikroglobuliny w płynie mózgowo-rdzeniowym w ostrej białaczkę limfoblastycznej i nieziarniczym chłoniaku złośliwym o wysokim stopniu złośliwości. *Adv Clin Exp Med* 2005;14:63–68.
- 31 Amin S, Parker A, Man J. ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Bioch Cell Biol* 2008;40:1654-1658.
- 32 Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, Summerfield GP. The prognostic value of CD38 expression and quantification in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymph* 2004;45:455-462.
- 33 Matthews C, Catherwood MA, Morris TC, Kettle PJ, Drake MB, Gilmore WS, Alexander HD. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol.* 2006;77:309-317.
- 34 Konoplev SN, Fritsche HA, O'Brien S, Wierda WG, Keating MJ, Gornet TG, St Romain S, Wang X, Inamdar K, Johnson MR, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. High serum thymidine kinase 1 level predicts poorer survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2010;134:472-477.
- 35 Ghia P. Clues on the origin and behavior of chronic lymphocytic leukemia cells. *Hematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2008;2:302-307.
- 36 Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A i wsp. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1910-1916.
- 37 Montserrat E, Moreno C. Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. *Curr Opin Oncol* 2009;21:609-614.
- 38 Jager U, Shechata M, Heintel D i wsp. Genetics in chronic lymphocytic leukemia: impacts for prognosis and treatment decisions. *Hematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2007; 1:115-121.
- 39 Rosenquist R. Clinical implications of novel biological markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2009;3:61-67.

- 40 Austen B, Skowronska A, Baker C, Powell JE, Gardiner A, Oscier D, Majid A, Dyer M, Siebert R, Taylor AM, Moss P, Stankovic T. Mutation Status of the Residual ATM Allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* 2007;25:5448-5457.
- 41 Austen B, Powell JE, Alvi A i wsp. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of *IgV_H* mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005;106:3175-3182.
- 42 Dicker F, Herholz H, Schnittger S i wsp. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009;23:117-124.
- 43 Castoldi GL, Cuneo A. Karyotype of chronic lymphocytic leukemia. *Hematologia* 2003; 88 (suppl. 10):28-29.
- 44 Szemraj Z, Jamroziak K, Robak T. Antygen CD38 jako czynnik prognostyczny w B-komórkowej przewlekłej białaczce limfocytowej. *Acta Haematologica*, 2007;38:2.
- 45 Deaglio S, Vaisitti T, Serra S, Audrito V, Bologna C, D'Arena G, Laurenti L, Gottardi D, Malavasi F. CD38 in Chronic Lymphocytic Leukemia: From Bench to Bedside? *Mini Rev Med Chem*. 2011 May 11.
- 46 Roliński J, Rupniewska ZM, Wąsik-Szczepanek E i wsp. Preliminary analysis of CD27 and CD38 expression on B-CLL cell. *Acta Haematol Pol* 2001;32 (suppl.1):86-88.
- 47 Hus I, Dmiszyńska A. ZAP-70 nowy czynnik prognostyczny w przewlekłej białaczce limfocytowej B-komórkowej *Acta Haematologica Polonica* 2004;35:3.
- 48 Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348:1764–1775.
- 49 Schroers R, Griesinger F, Trumper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L, Sellmann L, Duhrsen U, Durig J. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:750–758.
- 50 Rai KR, Wasil T. History of chronic lymphocytic leukemia. *Chronic lymphoid leukemia editio*, National Cancer Institute, New York 2001;1-7.
- 51 Anderson LA, Pfeiffer RM, Rabkin JS i wsp. Survival patterns among lymphoma patients with a family history of lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26:4958-4965.
- 52 Kupers R. Mechanism of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Rev Cancer* 2005;5:251-262.

- 53 Ghia P, Scielzo C, Frenquellii M, Muzio M, Caligaris-Cappio F. From normal to clonal B cells: Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2007;7:127-131.
- 54 Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99:1023–1029.
- 55 Thornton PD, Fernandez C, Giustolisi GM, Morilla R, Atkinson S, A'Hern RP, Matutes E, Catovsky D. CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J* 2004;5:145–151.
- 56 Bauvois B, De Meester I, Dumont J, Rouillard D, Zhao HX, Bosmans E. Constitutive expression of CD26/dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukemia *Br J Cancer*. 1999;79:1042-1048.
- 57 Fleisher B. CD26: a surface protease involved in T-cell activation 1994. *Immunol Today* 15:180-184.
- 58 Bauvois B. Molecular and functional aspects of human myelomonocytic ectopeptidases. In *Cell Surface Peptidases in Health and Disease*. wyd. Bios Ltd: Oxford. 1997;341-350.
- 59 Letarte M, Greaves A and Ishii E. The biological functions of CD10/endopeptidase 24.11 in normal and malignant cells. In *Cell Surface Peptidases in Health and Disease*, Kenny AJ and Boustead CM (eds), wyd. Bios Ltd: Oxford. 1997;329-337.
- 60 Cro L, Morabito F, Zucal N, Fabris S, Lionetti M, Cutrona G, Rossi F, Gentile M, Ferrario A, Ferrarini M, Molica S, Neri A, Baldini L. CD26 expression in mature B-cell neoplasia: its possible role as a new prognostic marker in B-CLL. *Hematol Oncol*. 2009;27:140-147.
- 61 Iwata S, Morimoto Ch. CD26/Dipeptidyl Peptidase IV in Context: the Different Roles of a Multifunctional Ecto-enzyme in Malignant Transformation. , 1999;190:301–305.
- 62 Yaron A, Naider F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1993;28:31-81.
- 63 Sokołowska-Wojdyło M, Maciejewska-Radomska A, Barańska-Rybak W, Lewandowski A, Cegielska A, Roszkiewicz J. Dipeptidyl-aminopeptidase IV (CD26) in clinical diagnosis of cutaneous T cell lymphomas. *Przegl Dermatol* 2010;97,74–78.
- 64 Liu Z, Christensson M, Forslöv A, De Meester I, Sundqvist KG. A CD26-controlled cell surface cascade for regulation of T cell motility and chemokine signals. *J Immunol*. 2009;183:3616-24. Epub 2009 Aug 17.
- 65 Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1723–1747.

- 66 Kotacková L, Baláziová E, Sedo A. Expression pattern of dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues in cancer. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55:77-84.
- 67 Molica S, Digiesi G, Mirabelli R i wsp. Serum level of CD26 predicts time to first treatment in early B-chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Hematology*. 2009;83: 208–214.
- 68 Broniarczyk-Dyła G, Prusińska-Bartoś M, Grzegorzczak J I wsp. Soluble receptors CD30 and CD26 in serum of patients with atopic dermatitis as markers of disease activity. *PDiA* 2005; XXII,5:219–226.
- 69 Kowal M, Wiliński G. Wybrane aspekty biologii choroby Hodgkina w świetle ostatnich badań. *Onkol. Pol.* 2000,3,2:109-115.
- 70 Ożóg J, Jarzab M, Pawlaczek A i wsp. Expression of DPP4 gene in papillary thyroid carcinoma. *Endokrynol Pol.* 2006;57(Suppl A):12-17.
- 71 Rasmussen HB, Branner S, Wiberg FC, Wagtmann N. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2002;10:19 - 25.
- 72 Warzocha K. Indywidualne strategie terapeutyczne w przewlekłej białaczce limfocytowej, *Hematologia* 2010;1:306–319.
- 73 Rodgers G, Young N. *Bethesda Handbook of Clinical Hematology*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 2005.
- 74 Robak P, Smolewski P. Współczesne poglądy na leczenie przewlekłej białaczki limfocytowej. *Acta Haematol Pol* 2011;42,1:53-62.
- 75 Eichhorst B, Goede V, Hallek M. Treatment of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:171-178.
- 76 Knauf W.U., Lissichkov T., Aldaoud A. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:4378–4384.
- 77 Cheson B.D. Ofatumumab, a novel anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2010;28:3525–3530.
- 78 Lewandowska M, Lewandowski K. Postępy w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej. *Współcz Onkol* 2006;10:330–333.
- 79 Nabhan C, Gartenhaus RB, Tallman MS. Purine nucleoside analogues and combination therapies in B-cell chronic lymphocytic leukemia: dawn of a new era. *Leuk Res.* 2004;28:429-442.
- 80 Robak T. Therapy of chronic lymphocytic leukaemia with purine nucleoside analogues: facts and controversies. *Drugs Aging*. 2005;22:983-1012.

- 81 Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, i wsp. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107:885-91.
- 82 Robak T., Jamroziak K., Góra-Tybor J. i wsp. Comparison of cladribine plus cyclophosphamide with fludarabine plus cyclophosphamide as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia: a phase III randomized study by the Polish Adult Leukemia Group (PALG-CLL3 Study). *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 1863–1869.
- 83 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D i wsp. 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.
- 84 Robak T, Moiseev S, Dmoszyńska A i wsp. Rituximab, fludarabine, and cyclophosphamide (R-FC) prolongs progression free survival in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) compared with FC alone: Final results from the international randomized phase III REACH trial [Abstract 157420]. *Blood*. 2008; 112:LBA-1.
- 85 Robak T, Jamroziak K, Robak P. Current and emerging treatments for chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*. 2009;69:2415-2449.
- 86 Hallek M., Fischer K., Fingerle-Rowson G. i wsp. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376:1164–1174.
- 87 Janssens A., Fof R., Keating M., Ouwens M., Tatt I., Carr E. Comparative efficacy of first line therapies for chronic lymphocytic leukemia: a systematic review and meta-analyses. *Blood* 2009;114:abstrakt 3432.
- 88 Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, i wsp. Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2009;27:498-503. Epub 2008 Dec 15.
- 89 Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T i wsp. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2007; 25:5616-5623.
- 90 Wierda W.G., Kipps T.I., Dürig J. i wsp. Ofatumumab combined with fludarabine and cyclophosphamide (O-FC) shows high activity in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL): results from a randomized, multicenter, international, two-dose, parallel group, phase II trial. *Blood* 2009;114: abstrakt 207.
- 91 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D i wsp. 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.

- 92 Bowen DA, Call TG, Jenkins GD i wsp. Methylprednisolone-rituximab is an effective salvage therapy for patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia including those with unfavorable cytogenetic features. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:2412-2417.
- 93 Castro JE, Sandoval-Sus JD, Bole J, Rassenti L, Kipps TJ. Rituximab in combination with high-dose methylprednisolone for the treatment of fludarabine refractory high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2008;22:2048-2053.
- 94 Dungarwalla M, Evans SO, Riley U, i wsp. High dose methylprednisolone and rituximab is an effective therapy in advanced refractory chronic lymphocytic leukemia resistant to fludarabine therapy. *Haematologica*. 2008;93:475-476.
- 95 Quinn JP, Mohamedbhai S, Chipperfield K, i wsp. Efficacy of rituximab in combination with steroids in refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:1995-1998.
- 96 European Medicines Agency. Arzerra: summary of opinion (initial authorization) [online]. Dostępne na URL: http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/opinion/Azerra_214261en.pdf [Accessed 2010 Jan 25].
- 97 Tsimberidou AM, Keating MJ. Treatment of fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2009;115:2824-2836.
- 98 Robak T. Novel monoclonal antibodies for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8:156-171.
- 99 Frankel AE, Surendranathan A, Black JH i wsp. Phase II clinical studies of denileukin diftitox diphtheria toxin fusion protein in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2006;15;106:2158-2164.
- 100 Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ i wsp. Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Jun 1;111:5291-5297.
- 101 Knauf W. Bendamustine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev. Anticancer Ther*. 2009;9:165-174.
- 102 Lissitchkov T, Arnaudov G, Peytchev D, Merkle Kh. Phase-I/II study to evaluate dose limiting toxicity, maximum tolerated dose, and tolerability of bendamustine HCl in pre-treated patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (Binet stages B and C) requiring therapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132:99-104.
- 103 Robak T, Lech-Maranda E, Korycka A, Robak E. Purine nucleoside analogs as immunosuppressive and antineoplastic agents: mechanism of action and clinical activity. *Curr Med Chem*. 2006;13:3165-3189.

- 104 Lech-Maranda E, Korycka A, Robak T. Clofarabine as a novel nucleoside analogue approved to treat patients with haematological malignancies: mechanism of action and clinical activity. *Mini Rev Med Chem*. 2009;9:805-812.
- 105 Galmarini CM. Drug evaluation: forodesine - PNP inhibitor for the treatment of leukemia, lymphoma and solid tumor. *Drugs*. 2006;9:712-722.
- 106 Korycka A, Lech-Marańda E, Robak T. Novel purine nucleoside analogues for hematological malignancies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2008;3:123-136.
- 107 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.
- 108 Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93:1732-1737.
- 109 Reinisch W, Willheim M, Hilgarth M i wsp. Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1994;12:2146-2152.
- 110 Sarfati M, Chevret S, Chastang C i wsp. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996;88:4259-4264.
- 111 Damle RN, Wasil T, Fais F i wsp. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1840-1847.
- 112 Ibrahim S, Keating M, Do KA i wsp. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:181-186.
- 113 Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL i wsp. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:893-901.
- 114 Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z i wsp. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2004;363:105-111.
- 115 Gattei V, Bulian P, Del Principe MI i wsp. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;111: 865-873.
- 116 Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND i wsp. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol* 2008;140:537-546.
- 117 Bulian P, Tarnani M, Rossi D i wsp. Multicentre validation of a prognostic index for overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol*. 2011;29:91-99.

- 118 Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848–1854.
- 119 Roos G, Krober A, Grabowski P i wsp. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;111:2246–2252.
- 120 Rossi D, Lobetti Bodoni C, Genuardi E i wsp. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter’s syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009;23:1062–1072.
- 121 Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D i wsp. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:859–861.
- 122 Wierda WG, O’Brien S, Wang X i wsp. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:4679–4685.
- 123 Shanafelt TD, Jenkins G, Call TG i wsp. Validation of a New prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2009;115:363–372.
- 124 Doubek M, Mayer J, Obrtlíková P i wsp. Modern and conventional prognostic markers of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the everyday hematological practice. *Eur J Haematol.* 2011; 29. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01639.x. [Epub ahead of print].
- 125 Cristina T, Ilaria N, Federico M i wsp. APRIL (A PROLIFERATION-INDUCING LIGAND) SERUM LEVELS PREDICT TIME TO FIRST TREATMENT IN PATIENTS AFFECTED BY B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. “Accepted Article” *Eur J Haematol.* 2011;19:doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01650.x.
- 126 Karl T, Chwalisz WT, Wedekind D i wsp. Localization, transmission, spontaneous mutations, and variation of function of the Dpp4 (Dipeptidyl-peptidase IV; CD26) gene in rats. *Regulatory Peptides* 2003;115:81–90.
- 127 Prabhash K, Khattry N, Bakshi A i wsp. Kode CD26 expression in donor stem cell harvest and its correlation with engraftment in human haematopoietic stem cell transplantation: potential predictor of early engraftment. *Annals of Oncology.*2010;21:582–588.
- 128 Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T i wsp. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci* 2008;13:2299–2310.
- 129 Tan EY, Mujoomdar M, Blay J. Adenosine down-regulates the surface expression of dipeptidyl peptidase IV on HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Am J Pathol* 2004;165:319-330.

- 130 Apelgren P, Hasselblom S, Werlenius O, Nilsson-Ehle H, Andersson PO. Western Sweden Lymphoma Group. Evaluation of clinical staging in chronic lymphocytic leukemia- population based study. *Leuk Lymphoma* 2006;47:2505–2516.

IX STRESZCZENIE

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (B-CLL) jest jedną z najczęściej występujących chorób limfoproliferacyjnych w krajach Europy Zachodniej (około 20-30% wszystkich białaczek u dorosłych). W 90% dotyczy osób po 50-60 roku życia, jednakże w ostatnich latach obserwuje się coraz więcej zachorowań wśród osób młodszych. Mężczyźni chorują dwukrotnie częściej niż kobiety. Schorzenie charakteryzuje się akumulacją we krwi obwodowej, szpiku kostnym, a także innych narządach limfatycznych dojrzałych limfocytów B o charakterystycznym profilu immunofenotypowym ($CD5^+CD19^+CD23^+$). Około 30% pacjentów wymaga włączenia leczenia przeciwnowotworowego już w momencie rozpoznania choroby. Kolejne 30% chorych nie wymaga leczenia w momencie stawiania diagnozy, a także w trakcie wielu lat obserwacji. Ze względu na różnorodny przebieg kliniczny choroby ustalenie jednolitej strategii terapeutycznej jest trudne. Zaproponowane około ćwierć wieku temu przez Rai'a i Binet'a systemy klasyfikacji klinicznej zaawansowania choroby znajdują zastosowanie w ocenie stopnia zaawansowania procesu nowotworowego. Ich przydatność przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych jest jednak ograniczona. W ostatnich latach zidentyfikowano szereg czynników rokowniczych takich jak aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH), stężenie $\beta 2$ -mikroglobuliny, aktywność kinazy tymidynowej, zawartość rozpuszczalnego receptora CD23 i CD44, stopień ekspresji CD38 i ZAP70 na komórkach białaczkowych oraz stan mutacyjny regionu zmiennego genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin. Ważnym czynnikiem rokowniczym okazała się być także obecność anomalii cytogenetycznych ($11q^-$, $17p^-$). Ocena ich obecności umożliwia przewidzenie dalszego przebiegu choroby u większości chorych. U niektórych pacjentów przebieg choroby jednak wyraźnie różni się od przewidywanego. Właśnie z tego powodu nieustannie poszukuje się nowych czynników prognozujących przebieg B-CLL w indywidualnych przypadkach. Jednym z takich nowych czynników wydaje się być ekspresja dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na komórkach białaczowych. CD26 jest enzymem o właściwościach proteazy serynowej uczestniczącym w reakcjach degradacji białek i małych polipeptydów (w tym m. in. czynników wzrostu i hormonów), w których w przedostatniej pozycji łańcucha polipeptydowego obecna jest prolina, alanina lub hydroksyprolina (Xaa-Proo lub Xaa-Ala). Badania innych autorów wykazały brak lub niską ekspresję CD26 na komórkach chłoniaka folikularnego i chłoniaka komórek płaszczka, oraz wysoką ekspresję CD26 na komórkach białaczki włochatokomórkowej. Ekspresja CD26 na komórkach B-CLL i

chłoniaka z dużych rozlanych komórek B jest zmienna. Dotychczasowe doniesienia pozwalają przypuszczać, że jej obecność może mieć znaczenie prognostyczne u pacjentów z B-CLL.

Celem pracy była ocena znaczenia prognostycznego ekspresji dipeptydylopeptydazy IV/CD26 na komórkach białaczkowych u chorych na B-CLL oraz ocena związku jej ekspresji z obecnością innych uznanych czynników rokowniczych przepowiadających niepomyślny przebieg choroby, takich jak wysoka ekspresja CD38, ZAP70, aktywność LDH, stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi czy też obecność określonych aberracji cytogenetycznych (w tym 11q-, 17p-) w komórkach białaczkowych. Niezależnej ocenie poddano także związek pomiędzy ekspresją CD26 na komórkach B-CLL a czasem do włączenia leczenia cytostaticznego (TTT).

Materiał i metody: ocenie poddano 162 chorych (92 mężczyzn i 70 kobiet) w wieku 29 do 84 lat (mediana 58 lat) z rozpoznaniem B-CLL. Ekspresję CD26, CD38, ZAP70, CD5, CD19, CD23 oznaczono metodą ośmiokolorowej cytofluorymetrii przepływowej. Aktywność LDH, a także stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi oceniono stosując gotowe zestawy komercyjne oraz standardowe metody laboratoryjne. Badanie w kierunku obecności delecji 13q14.3, 13q34, 11q22-23, 17p13 oraz trisomii chromosomu pary 12 wykonywano za pomocą metody FISH interfazowej. W celu analizy statystycznej danych zastosowano statystyki opisowe: średnią arytmetyczną, medianę, minimum, maximum, dolny kwartył, górny kwartył, odchylenie standardowe i błąd standardowy. Ocenę zgodności przeprowadzono testem Shapiro-Wilka. Istotność różnic wartości średnich o rozkładzie normalnym sprawdzono testem t-Studenta, a jednorodność wariancji testem Bartlett'a. Istotność różnic wartości średnich o rozkładzie różnym od normalnego lub o niejednorodnych wariancjach, sprawdzono nieparametrycznym testem U Manna-Whitney'a. Dla zweryfikowania różnic pomiędzy średnimi zastosowano test Tukey'a. Istotność różnic średnich w trzech grupach dla parametrów o rozkładzie różnym od normalnego lub niejednorodnych wariancjach sprawdzono testem nieparametrycznym Kruskala-Wallis'a. Dla par parametrów o rozkładach normalnych obliczono współczynnik korelacji Pearson'a, dla par parametrów o rozkładzie różnym od normalnego obliczono współczynnik korelacji Spearman'a - r. W celu oceny prawdopodobieństwa przeżycia zastosowano metodę Kaplana - Meiera. Do oceny różnicowania natężeń cech pomiędzy badanymi parami parametrów wykorzystano test χ^2 lub test χ^2 z poprawką Yates'a. Dla wybranych sześciu zmiennych wykonano analizę skupień oraz wykorzystano technikę k-średnich. Dla oznaczenia poziomu istotności stwierdzonych związków lub różnic (wartości p) zastosowano następujące

oznaczenia: ns – $p \geq 0,05$ – wartość nieistotna statystycznie, * – $p < 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ wartość istotna statystycznie.

Wyniki: Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że odsetek komórek białaczkowych wykazujących ekspresję antygenu CD26 wzrasta wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai. Odsetek komórek z obecnością ekspresji CD26 był istotnie statystycznie wyższy u pacjentów z podwyższoną aktywnością LDH i ze zwiększonym stężeniem β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi oraz w grupie pacjentów wymagających podjęcia leczenia. Ilość komórek CD26⁺ odwrotnie korelowała z TTT. Grupę pacjentów CD26⁺ w porównaniu do grupy CD26⁻ charakteryzowało także istotnie mniejsze prawdopodobieństwo długiego całkowitego przeżycia (OS). Uzyskane wyniki pozwoliły na skonstruowanie modelu prognostycznego uwzględniającego stadium zaawansowania klinicznego choroby według klasyfikacji Rai, ekspresję CD26, CD38, ZAP70 na komórkach białaczkowych, aktywność LDH i stężenie β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi. Model ten pozwolił na identyfikację dwóch grup o korzystnym i niekorzystnym rokowaniu.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Ekspresja CD26 na $\geq 10\%$ komórek CD5⁺/CD19⁺/CD23⁺ wiąże się ze skróceniem przeżycia całkowitego u chorych z B-CLL ($p=0,0391^*$).
2. Chorzy z ekspresją CD26 na $\geq 10\%$ komórek CD5⁺/CD19⁺/CD23⁺ szybciej wymagają rozpoczęcia leczenia ($p=0,03509^*$)
3. Ekspresja CD26 na komórkach CD5⁺CD19⁺CD23⁺ wykazuje związek ze stopniem zaawansowania klinicznego według Rai, koniecznością włączenia leczenia cytostatycznego, aktywnością LDH i stężeniem β_2 -mikroglobuliny w surowicy krwi.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa, dipeptydylopeptydaza IV/CD26, ZAP70, CD38, czas do podjęcia terapii, całkowite przeżycie, rokowanie

X SUMMARY

B-cell chronic lymphocytic leukemia is one of the most common lymphoproliferative diseases in Western Europe (approximately 20-30 percent of all cases of leukemia in adults). The majority (90 percent) of all cases is for patients between 50 and 60 years old, but in recent years, more and more cases are reported among younger people. In general, men get sick twice as often as women. The disease is characterized by accumulation of mature B-cells with a immunophenotyping ($CD5^+CD19^+CD23^+$) profile in the peripheral blood, bone marrow and other lymphoid nodes. Approximately 30 percent of patients require anti-cancer treatment at the time of diagnosis. Another 30 percent may not require treatment at the time of diagnosis and many years after. Due to such a diversity in clinical course of disease it is difficult to come up with a single therapeutic strategy that could be applied successfully to all the patients. Criteria for the disease classification that have been defined about a quarter of a century ago by Rai and Binet are used to determine severity of the disease. Their usefulness in making therapeutic decisions, however, is limited. Over the last few years new isolated prognostic factors have been identified such as lactic acid dehydrogenase (LDH), concentration of β_2 -microglobulin, thymidine kinase activity, soluble receptor CD23 or CD44, level of expression of CD38 or ZAP70 in leukemic cells and mutational status of immunoglobulin heavy chain variable region genes. Another important prognostic factor is presence of cytogenetic abnormalities ($11q^-$, $17p^-$). Despite of this multitude of different factors available used to facilitate the decision on the therapeutic approach, the course of the disease clearly differs for some patients from the expected outcome. Consequently, for this reason alone new agents are still being looked at in individual cases. One of these new factors seems to be expression of dipeptidyl peptidase IV/CD26. It is an enzyme with properties of a serine protease and is engaged in degradation reactions of proteins and small polypeptides (including, among others growth factors and hormones), that have proline, alanine, or hydroxyproline, (Xaa-Proo or Xaa-Al) in the penultimate position of the polypeptide chain. Studies of other authors showed no or low expression of CD26 on cells of follicular or mantle cell lymphoma, and high expression of CD26 on cells of hairy-cell leukemia. Expression of CD26 on cells of B-CLL and diffuse large B-cell cells lymphoma is variable. Previous reports clearly suggest though that its presence may have prognostic significance in patients with B-CLL.

The aim of this study was to assess firstly prognostic significance of expression of dipeptidyl peptidase IV/CD26 in leukemic cells for patients with B-CLL and secondly to identify its relationship with presence of other known prognostic factors associated with unfavorable course of the disease, such as high expression of CD38, ZAP70, LDH, the concentration of β_2 -microglobulin in the serum or presence of specific cytogenetic aberrations (including 11q-, 17p-) in leukemic cells. Additionally, evaluation of the relationship between expression of CD26 on B-CLL cells and time to include chemotherapy has been undertaken (TTT).

Material and methods: The study included 162 diagnosed patients (92 males and 70 females) aged 29 to 84 years (median 58 years) diagnosed with B-CLL. Expression of CD26, CD38, ZAP70, CD5, CD19, CD23 was determined by a method of flow cytometry. LDH activity, as well as β_2 -microglobulin concentration in serum was evaluated using commercial testing kits and standard laboratory methods. The test for the presence of deletion 13q14.3, 13q34, 11q22-23, 17p13, and trisomy of 12 chromosome was performed using interphase FISH method. In order to analyze the statistical data extensive descriptive statistics has been used such as the arithmetic mean, median, minimum, maximum, lower quartile, upper quartile, standard deviation and standard error. Conformity assessment was performed with Shapiro-Wilk test. The significance of differences of mean values for normal distribution was tested with Student's t-test, and homogeneity of the variance with test of Bartlett. The significance of differences of average values for distribution different from normal or heterogeneous variances was tested with non-parametric test by Mann-Whitney. To verify the differences between means Tukey's test was used. The significance of differences in average values of parameters for tested groups that do not belong to the normal distribution or homogeneous variances for non-parametric values were tested accordingly to verification by Kruskal-Wallis. For pairs of parameters with normal distributions Pearson's correlation coefficients were calculated while for pairs of parameters with different than normal distribution Spearman correlation coefficient was found. In order to assess the probability of survival Kaplan – Meier model was used. To assess differentiation between stimulus intensity characteristics of pairs of parameters χ^2 test or χ^2 test with the amendment Yates'a was used. For selected six variables, cluster analysis was performed and k-means technique used. To determine level of materiality in established relationships or differences (p values), the following indications were chosen: ns - $p \geq 0.05$ – for a value not statistically significant, * - $p < 0.05$, ** - $p \leq 0.01$ for statistically significant one.

Results: Percentage of leukemic cells with presence of CD26 antigen expression on their surface grows in alignment with Rai's classification. Expression of CD26 was significantly

SUMMARY

higher for patients with elevated LDH or elevated β_2 -microglobulin as well as in the group of patients that required immediate treatment. Level of the CD26 expression has been found to be inversely correlated with time to include the treatment. Groups of patients with the presence of CD26 expression in at least 10% of leukemic cells was characterized by a significantly lower probability of OS, compared to the group of patients with CD26⁻. The data obtained allowed us to construct a predictive model that takes into account both Rai's stage of the disease, expression of CD26, CD38, ZAP70, LDH as well as β_2 -microglobulin concentrations in serum. Based on this model, two patient groups have been identified, one with favorable and another one with unfavorable prognosis.

Conclusions:

- 1 Expression of CD26 on $\geq 10\%$ of the cells CD5⁺/CD19⁺/CD23⁺ is associated with shortened overall survival in patients with B-CLL (p=0.0391*).
2. Patients with expression of CD26 on $\geq 10\%$ of the cells, CD5⁺/CD19⁺/CD23⁺ require faster initiation of treatment (p=0.03509*).
3. Expression of CD26 on cells of CD5⁺/CD19⁺/CD23⁺ shows a relationship between tumor stage according to Rai, necessity to incorporate cytostatic treatment, LDH activity and serum β_2 -microglobulin.

Key words: B-cell chronic lymphocytic leukemia, dipeptidyl peptidase IV, CD26, ZAP70, CD38, time to treatment, overall survival, prognosis