

Využitie prietokovej cytometrie pri stanovení prognostických markerov CD38 a ZAP-70 u pacientov s B-CLL

MVDr. Alica Elbertová

Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Košice

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je definovaná ako lymfoproliferatívne ochorenie zapríčinené klonálnou proliferáciou a akumuláciou maligne transformovaných, malých zreých B lymfocytov v periférnej krvi, lymfatických uzlinách, slezine a kostnej dreni. Klinický priebeh CLL je variabilný. Bol preukázaný významný prognostický dosah rôznych CLL biomarkerov, ako sú IgV_H mutačný status, chromozomálne abnormality ako aj expresia CD38 a ZAP-70. Expresia ZAP-70 alebo CD38 koreluje s nemutovaným stavom IgV_H génov a je spojená s horšou prognózou. Imunofenotypová analýza pomocou prietokovej cytometrie je vhodná nielen na detekciu charakteristického imunofenotypového profilu buniek B CLL, ale aj na stanovenie ich intracelulárnej expresie ZAP-70.

Kľúčové slová: prietoková cytometria, prognostické markery, B CLL, ZAP-70.

The Utility of Flow Cytometry for Evaluation of Prognostic Factors CD38 and ZAP-70 in B-CLL Patients

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a lymphoproliferative disease characterised by the clonal proliferation and progressive accumulation of malignant transformed small mature B cells in the peripheral blood, lymph nodes, spleen and bone marrow. The clinical course of CLL is variable. An important prognostic impact has been shown for different CLL biomarkers such as IgV_H mutation status, chromosomal aberrations, CD38 and ZAP-70 expression. The expression of ZAP-70 or CD38 has been correlated with the expression of unmutated IgV_H genes and could predict poor prognosis. The flow cytometry immunophenotyping is useful not only for the detection of unique B-CLL phenotype of the pathological B cells but also for detection of their intracytoplasmic ZAP-70 expression.

Key words: flow cytometry, prognostic markers, B CLL, ZAP-70.

NewsLab, 2015; roč. 2(1): 39–41

Chronická lymfocytová leukémia z B lymfocytov (B-CLL) je definovaná ako nízkoagresívne lymfoproliferatívne ochorenie zapríčinené klonálnou proliferáciou maligne transformovaných malých zreých B lymfocytov. Tieto bunky so špecifickým imunofenotypom sa akumulujú v periférnej krvi, kostnej dreni, lymfatických uzlinách, prípadne v iných hemopoetických a non-hemopoetických orgánoch. Príčinou nárastu počtu lymfocytov nie je len ich nadmerná klonálna proliferácia, ale aj porucha apoptózy (1). Podľa kritérií medzinárodného konsenzu o B-CLL (tzv. kritériá IWCLL) je ochorenie definované prítomnosťou monoklonovej lymfocytózy v periférnej krvi nad $5 \times 10^9/l$, trvajúcou najmenej 3 mesiace a spoločne so stanovením typického imunofenotypového profilu patologických buniek prietokovou cytometriou sú dostatočnými kritériami na diagnostiku B-CLL (2). WHO klasifikácia sa opiera o laboratórnu diagnostiku B lymfocytov (morfologické, imunofenotypové, genetické, ako aj molekulovo-biologické parametre) a klinické prejavy ochorenia.

B-CLL tvorí cca 25 % – 30 % z leukémií dospelých v Európe a Severnej Amerike, čím sa zaraďuje k najčastejšie sa vyskytujúcim leukémiám (1). Keďže je roky bezpríznaková, často sa diagnostikuje iba náhodne (asi 50 % prípadov) pri vyšetrení parametrov krvného obrazu.

B-CLL sa vyznačuje veľkou heterogenitou a variabilným priebehom ochorenia, ktorý rozdeľuje pacientov na skupinu s indolentným cha-

rakterom a na skupinu s agresívnym, rýchlo progredujúcim ochorením a krátkodobým prežívaním (3). Snaha opierať sa pri manažmente terapie o vybrané parametre s prognostickým významom vyplýva z biologickej nehomogenosti B-CLL rozpoznateľnej na morfolologickej, fenotypovej a genetickej úrovni. Koncom 90. rokov 20. storočia vstúpili pri štúdiu biologickej heterogenity B-CLL do popredia genetické a molekulovo-biologické parametre, ktoré umožnili rozdelenie dovtedy známych prognostických markerov na **klasické** (staré, respektíve klinické) a na **molekulové** (nové, moderné) (4).

K novým prognostickým markerom zaraďujeme mutačný stav IgV_H génov, expresiu CD38, expresiu ZAP-70, chromozómové abnormality (del17p, del11q, del 6q, trizómia 12 a del 13q) a mutáciu génu TP53. Prítomnosť somatických mutácií v hypervariabilných úsekoch (IgV_H) génov pre ťažké reťazce imunoglobulínov umožnila zdefinovať prognózu a dĺžku prežívania pacientov. Nemutovaný stav IgV_H génov (homológia vo > 98,0 % sekvencií) koreluje s nepriaznivou prognózou a kratším mediánom prežívania a naopak, za prognosticky priaznivý stav sa považuje prítomnosť somatických mutácií vo $\geq 2,0$ % sekvencií (4).

Stanovenie mutačného stavu IgV_H je všeobecne považované za technologicky, časovo i finančne náročné a v súčasnosti ťažko realizovateľné v bežných laboratórnych podmienkach pre náročnosť spracovania materiálu (5).

Tabuľka 1. Porovnanie niektorých metodík na stanovenie ZAP-70 prietokovou cytometriou

Metóda	anti-ZAP-70	Fixácia/permeabilizácia	Analýza	Cut-off	Autor
Priama IF	1E7.2 Alexa-488 Caltag	Fix and Perm, Caltag	Izotypová. vs. T/NK kontrola	20 %	Zucchetto et al., 2006 (20)
Nepriama IF	2F3.2 Upstate	Paraformaldehyd-Tween	Izotypová kontrola	10 %	Orchard et al., 2004 (12)
Priama IF	1E7.2 Alexa-488 BD	Paraformaldehyd-Saponin	Izotypová kontrola	20 %	Rassenti et al., 2004 (11)
Priama IF	1E7.2PE Caltag	Fix and Perm, Caltag	T/NK kontrola	20 %	D'Arena et al., 2007 (13)
Priama IF	136F12 Alexa 647 Cell Signaling	Intraprep, Beckman-Coulter	Izotypová kontrola	25 %	Slack et al., 2007 (24)
Priama IF	SBZAP PE, BC	Formaldehyd/Triton X-100	MFI		Shankey et al., 2006 (17)
Nepriama IF	2F3.2 Upstate	Fix and Perm, Caltag	T/NK kontrola	20 %	Crespo et al., 2003 (9)

Vysvetlivky: IF – imunofluorescenčná metóda, BD – Becton Dickinson, BC – Beckman Coulter, MFI – Mean Fluorescence Intensity

Expresia CD38 bola prvým markerom, pri ktorom sa preukázala korelácia s IgV_H statusom. CD38 je 45kDa transmembránový glykoproteín, ktorý pôsobí súčasne ako enzým a receptor. Vyšetrenie expresie CD38 na povrchu leukemických buniek prietokovou cytometriou je v klinických laboratóriách relatívne dostupné, avšak jeho použitie ako prognostického markera pri B-CLL sa postupom času ukázalo ako nejednoznačné. Predovšetkým sa nepotvrdila absolútna korelácia expresie s IgV_H mutačným statusom a objavili sa aj rôzne názory na stabilitu expresie antigénu CD38 a na určenie cut-off hodnoty pre pozitivitu CD38 na leukemických bunkách z prognostického hľadiska (hodnoty od 7 % až do 20 %, respektíve 30 %) (6). V súčasnosti sa za klinicky relevantnú mieru expresie považuje arbitrárne (štatisticky) určená hodnota v klinických laboratóriách $\geq 30\%$ detegovaná prietokovou cytometriou (4). Časť pacientov vykazuje bimodálny profil expresie, najbežnejšie sa pozoruje zmena CD38 negativity na CD38 pozitivitu, ktorá sa často spája s progresiou ochorenia (7).

Expresia proteínu ZAP-70 patrí medzi ďalšie prognosticky významné parametre, o ktorých sa uvažovalo, že nahradia stanovenie IgV_H, ZAP-70, zeta asociovaný proteín s molekulovou hmotnosťou 70 kDa, je kódovaný génom na dlhom ramienku 2. chromozómu v 2q2 lokuse (8). Táto tyrozín kináza z rodiny tzv. Syk proteínov obsahuje dve terminálne SH2 domény a C-terminálnu kinázovú doménu. Miestom primárnej expresie proteínu ZAP-70 je cytoplazma T a NK lymfocytov (9). ZAP-70 proteín bol identifikovaný ako fosforylačný partner zeta reťazca CD3 komplexu asociovaného s TCR (T bunkový receptor) komplexom na T lymfocytoch. Aktivácia T lymfocytov prostredníctvom signálu odovzdaného cez TCR receptor je nevyhnutná na vývoj imunitnej odpovede, z čoho vyplýva, že ZAP-70 zohráva kľúčovú úlohu v TCR signalizácii. Deficit ZAP-70 má za následok absenciu maturovaných CD8+ lymfocytov, blokuje aktiváciu CD4+ T lymfocytov sprostredkovanú cez TCR a môže spôsobiť autozomálne dedičnú formu ťažkého kombinovaného deficitu špecifickej imunity (Severe Combined Immunodeficiency – SCID) (10). Proteín ZAP-70 exprimujú v rôznej miere aj B lymfocyty a nádorové bunky viacerých typov B NHL vrátane B-CLL (8). Expresia proteínu ZAP-70 koreluje s nemutovaným stavom IgV_H génov, a teda pozitívna expresia ZAP-70 predstavuje

nepriaznivú prognózu (9). Pri B-CLL ZAP-70 pravdepodobne zosilňuje signálne dráhy sprostredkované receptorom B lymfocytov, čo je proces prispievajúci k horšej prognóze u ZAP-70 pozitívnych pacientov. Podobne ako pri T lymfocytoch, má ZAP-70 význam pre chemokínovú stimuláciu buniek B-CLL. Predpokladá sa, že expresia ZAP-70 by mohla viesť k migrácii leukemických buniek do mikroprostredia výhodného na prežitie či proliferáciu. Avšak korelácia medzi expresiou ZAP-70 a mutačným stavom IgV_H génov nie je absolútna, a teda prítomnosť diskordantných nálezov (v závislosti od použitej metódy detekcie od 8 % do 25 %) potvrdzuje ZAP-70 ako nezávislý prognostický faktor (4). Pri porovnaní vzájomnej korelácie IgV_H a CD38, respektíve ZAP-70, je štatisticky významnejšia korelácia IgV_H a ZAP-70 (11, 12). Keďže ZAP-70 a CD38 vzájomne nekorelujú, ich súčasné stanovenie má väčšiu výpovednú hodnotu pri identifikácii pacientov s rôznou prognózou než analýza len jedného izolovaného parametra. Kombinovaná analýza CD38 a ZAP-70 umožňuje identifikovať jednak skupinu pacientov s dobrou prognózou, ktorí vykazujú fenotyp CD38-/ZAP-70-, skupinu s nepriaznivou prognózou (fenotyp CD38+/ZAP-70+), ako aj pacientov s diskordantným fenotypom CD38-/ZAP-70+, respektíve CD38+/ZAP-70- a stredným rizikom (13).

Na stanovenie ZAP-70 sa v súčasnosti využívajú imunohistochemické (semikvantitatívne hodnotenie) a imunocytochemické metódy, Western-blotting, analýza mRNA a tiež prietoková cytometria (8). Interpretáciu analýzy pomocou Western-blotingu komplikuje prípadná kontaminácia vzorky T lymfocyty, čo môže viesť k falošne pozitívnym výsledkom (14). Preto sa do popredia dostáva snaha o zavedenie spoľahlivej, rutínnej a relatívne jednoduchšej metódy pomocou prietokovej cytometrie.

Bolo vypracovaných niekoľko protokolov na detekciu ZAP-70, ako aj odporúčani na interpretáciu výsledku expresie ZAP-70 (tabuľka 1). Detekciu expresie ZAP-70 prietokovou cytometriou komplikujú viaceré problémy, ku ktorým sa zaraďuje predovšetkým slabá expresia ZAP-70 v cytoplazme patologických B lymfocytov a chýbanie jednotne používanej štandardizovanej metódy (3, 16).

Popri metódach so separovanými mononukleárnymi bunkami sú vypracované protokoly s imunofenotypovou analýzou plnej krvi. Pracovné

postupy sa ďalej odlišujú v používaní rôznych klonov anti-ZAP-70 protilátok priamou, respektíve nepriamou imunofluorescenčnou metódou. Pomerne veľká variabilita je aj vo fixačno-permeabilizačných metódach, používaní rôznopočetných multifarebných protokolov a analytickej stratégie (tvorba logických „gate“, určenie cut-off pozitivity) (tabuľka 1).

Pri interpretácii výsledkov analýzy sa autori opierajú o vyjadrenie pozitivity expresie ZAP-70 v percentách, alebo vyjadrujú pomernú priemernú intenzitu fluorescencie (MFI). Expresiu ZAP-70 sa deteguje v percentách vo vzťahu k externej negatívnej, izotypovej kontrole, internej pozitívnej kontrole (T lymfocyty, NK lymfocyty), internej negatívnej kontrole (CD5-B lymfocyty) alebo negatívnej kontrole zdravých kontrol, kde sa cut-off pozitivity ZAP-70 pohybuje v rozmedzí 10 % až 30 %. Pri pomernom vyjadrení MFI sa pozitívna expresie ZAP-70 stanoví koeficientom MFI CD3+ T lymfocytov k MFI CD5+ B lymfocytov (T/CLL B), podielom MFI CD5+ B lymfocytov voči CD5- B lymfocytom (CLL B/B Ly), respektíve T lymfocytom (CLL B/T) (6, 9, 12, 15, 17 – 23).

V porovnaní s IgV_H je cytometrické stanovenie CD38 a ZAP-70 menej finančne a časovo náročné (9). Prietoková cytometria sa stala metódou voľby aj pre svoju relatívnu jednoduchosť a dostupnosť. Umožňuje špecifické ohraničenie cieľovej populácie buniek a odlišenie expresie ZAP-70 na patologickom klone B lymfocytov od výraznej pozitivity ZAP-70 v cytoplazme T a NK lymfocytov. Expresia ZAP-70 môže byť relevantnejším prognostickým indikátorom definujúcim B-CLL s horšou prognózou pri nemutovanom IgV_H stave.

Tento článok vznikol na základe výskumných aktivít v projekte, ktorý bol podporený v rámci OP Výskum a vývoj, s názvom: Výskumné centrum moderných technológií monitorovania a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie, ITMS 26220220197, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Adam Z, Vorlíček J, et al. *Hematologie II: Přehled maligních hematologických nemocí*. 1. vyd. Praha, Česká republika: Grada Publishing; 2001: 680.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446–5456.
- Váleková L, Chudej J, Sokol J. Laboratórna diagnostika CLL: cytológia, prietoková cytometria. *Onkológia*. 2014;9(3):166–172.
- Balhárek T, Barthová M, Szépe P, Marcinek J, Burjanivová T, Plank L. Komentár k vývoju konceptu prognostických faktorov chronickej lymfocytovej leukémie: Cesta od prognostických faktorov k prediktorom liečebnej odpovede. *Klin.Onkol*. 2009;22(6):254–263.
- Bosh F, Muntanola A, Giné E, Cario A, Villamor N, Moreno C, Crespo M, Montserrat E. Clinical Implications of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B*. 2006;70B:214–217.
- Rassenti LZ, Kipps TJ. Clinical Utility of Assessing ZAP-70 and CD38 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B*. 2006;70B:209–213.
- van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Reviews*. 2009;23:25–47.
- Béné MCh. What is ZAP-70? *Cytometry Part B*. 2006;70B:204–208.
- Crespo M, Bosh F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, et al. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764–1775.
- Exbio Bulletin. ZAP-70. 2005: 6.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, et al. 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.
- Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiensner A, Rosenwald A, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363:105–111.
- D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, Vaisitti T, Aydin S, et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Hematology*. 2007;82:787–791.
- Urbanová A, Janega P, Masárová K, Štefániková Z, Babál P. Imunohistochemická detekcia proteínu ZAP-70 a jej význam v diagnostike B-CLL. *Česko-slovenská patológia*. 2009;45(2):40–45.
- Bakke AC, Purtzer Z, Leis J, Huang J. A Robust Ratioetric Method for Analysis of ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Cytometry Part B*. 2006;70B:227–234.
- Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2007;20:455–468.
- Shankey TV, Forman M, Scibelli P, Cobb J, Smith CM, et al. An Optimized Whole Blood Method for Flow Cytometric Measurement of ZAP-70 Protein Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B*. 2006;70B:259–269.
- Bekkema R, Tadema A, Daenen SMGJ, Kluin Nelemans HC, Mulder AB. An Improved Flow Cytometric Method Using FACS Lysing Solution for Measurement of ZAP-70 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytometry Part B*. 2008;74B:40–44.
- Degheidy HA, Venzon DJ, Farooqui MZH, Abbasi F, Arthur DC. Combined Normal Donor and CLL: Single Tube ZAP-70 Analysis. *Cytometry Part B*. 2012;82B:67–77.
- Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M, Nanni P, Bulian P, et al. ZAP-70 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Evaluation by External (Isotypic) or Internal (T/NK Cells) Controls and Correlation with IgV_H Mutations. *Cytometry Part B*. 2006;70B:284–292.
- Chen Y, Peterson LC, Dittmann D, Evens A, Rosen S, et al. Comparative Analysis of Flow Cytometric Techniques in Assessment of ZAP-70 Expression in Relation to IgV_H Mutational Status in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:1882–1891.
- Best OG, Ibbotson RE, Parker AE, Davis ZA, Orchard JA, Oscier DG. ZAP-70 by Flow Cytometry: A Comparison of Different Antibodies, Anticoagulants, and Methods of Analysis. *Cytometry Part B*. 2006;70B:235–241.
- Rossi M, Delprincipe MI, Rossi D, Consalvo MI, Luciano F, et al. Prognostic impact of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia: mean fluorescence intensity T/B ratio versus percentage of positive cells. *J. of Translational Medicine*. 2010;8:1–11.
- Slack GW, Wizniak J, Dabbagh L, Shi X, Gelebart P, et al. Flow Cytometric Detection of ZAP-70 in Chronic Lymphocytic Leukemia. Correlation With Immunocytochemistry and Western Blot Analysis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:50–56.



MUDr. Alica Elbertová
Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
alica.elberova@medirex.sk