

Molekulová analýza prognosticky významných markerov chronickej lymfocytovej leukémie

Mgr. Erika Tomková, Mgr. Jakub Petřík, RNDr. Renata Lukačková, RNDr. Miroslav Tomka, PhD.
Medirex, a. s., Bratislava

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je klinicky a biologicky značne heterogénne ochorenie. Pacienti sa vo všeobecnosti rozdeľujú na dve skupiny, a to na pacientov s indolentnou formou ochorenia a pacientov s agresívnou formou so zlou prognózou. Najspoľahlivejšími prognostickými markermi využívanými v klinickej praxi sú stanovenie mutačného statusu génu *IGHV*, ktorý kóduje variabilnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu, a detekcia významných chromozómových aberácií. V súbore 200 pacientov sme študovali zastúpenie a mutačný status génov *IGHV* a zisťovali prítomnosť trizómie 12 a delécií 11q22-23, 13q14 a 17p13 v slovenskej populácii. Na záver sme sa snažili interpretovať vzájomný vzťah týchto prognostických markerov.

KLúčové slová: chronická lymfocytová leukémia, prognostické markery, chromozómové aberácie, *IGHV*

Molecular analysis of significant prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a clinically and biologically heterogeneous disease. The majority of patients have an indolent disease course, while others may experience a far more aggressive disease and poor overall survival. Two of the most reliable molecular prognostic markers, both of which are offered in routine diagnostics, are the mutational status of the immunoglobulin heavy chain variable region gene (*IGHV*) and detection of relevant genomic aberrations. Here, we studied repertoire and mutational status of *IGHV* genes, and the presence of trisomy 12 and deletions of 11q22-23, 13q14, 17p13 in a cohort of 200 patients from Slovakia. Finally, we tried to interpret the relationship of these prognostic markers.

Keywords: chronic lymphocytic leukaemia, prognostic markers, genetic aberrations, *IGHV*

NewsLab, 2017; roč. 8(1): 38 – 43

Úvod

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je lymfoproliferatívne ochorenie charakterizované akumuláciou zrelých monoklonálnych B-lymfocytov v periférnej krvi, kostnej dreni a lymfatických tkanivách. Je najčastejšou leukémiou dospelých západného sveta a postihuje najmä pacientov starších ako 50 rokov. Pri CLL bola pozorovaná značná diverzita v morfológii, imunofenotype, cytogenetike a molekulových znakoch buniek, ktorá vyúsťuje do variabilného klinického priebehu a odpovede na liečbu. Približne jedna tretina pacientov preživa dlhšie ako 20 rokov po diagnostikovaní ochorenia a nevyžaduje terapiu, u niektorých pacientov, naopak, ochorenie rapídne progreduje a je spojené s ďalšími komplikáciami⁽¹⁾.

Vzhľadom na klinickú heterogenitu CLL bolo potrebné nájsť vhodné parametre na stratifikáciu pacientov do prognostických skupín s cieľom uľahčiť výber vhodnej liečebnej stratégie od „watch-and-wait“ po alogénnu transplantáciu kmeňových buniek. V súčasnosti je určenie rizikového profilu CLL založené na identifikácii tzv. nových prognostických faktorov, medzi ktoré patria aj chromozómové aberácie a mutačný stav génu *IGHV*. Tieto faktory sú nezávislé od klinického štádia a umožňujú predikovať prognózu ochorenia už v čase diagnózy. Znalosť genotypu CLL buniek je základom individuálneho prístupu ku každému pacientovi a ovplyvňuje terapeutický postup⁽²⁾.

Chromozómové aberácie

Napriek relatívnej genómovej stabilite CLL buniek sa až u 80 % pacientov vyskytujú chromozómové aberácie⁽³⁾.

Najčastejšími chromozómovými abnormalitami s prognostickým charakterom sú parciálne delécie 13q14, 11q22-23 a 17p13, menej frekventovaná je trizómia chromozómu 12. Delécia 13q14 predstavuje najčastejšiu cytogenetickú aberáciu pri CLL. Samostatná del13q14 je charakterizovaná benigným priebehom ochorenia, v prípade kombinácie s inou aberáciou sa jej pozitívny prognostický význam stráca. Trizómia 12 je najčastejšou CLL aberáciou, pri ktorej dochádza k amplifikácii genetického materiálu. V niektorých prípadoch ide len o duplikáciu segmentu medzi 12q13 a 12q21.2⁽⁴⁾. Delécia 11q22-23 je asociovaná s horšou prognózou, pretože narúša expresiu génu *ATM* (ataxia teleangiectasia mutated), spôsobuje dereguláciu bunkového cyklu a vedie k akumulácii maligných B-lymfocytov náchylných na vznik prídavných genetických aberácií. Delécia 17p13 je asociovaná s veľmi agresívnym priebehom ochorenia a so slabou odpoveďou na terapiu v dôsledku deregulácie expresie *TP53*⁽⁵⁾. Prítomnosť aberácií *TP53* zaraďuje pacienta do „ultra high-risk“ CLL skupiny. Zriedka sa vyskytuje samostatne, zvyčajne je asociovaná s ďalšími aberáciami⁽⁵⁾.

Somatické mutácie *IGHV*

Nezávislým prognosticky významným markerom CLL je stanovenie mutačného statusu *IGHV*, ktorý kóduje variabilnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínov. V roku 1999 Damle a kolektív uverejnili publikáciu, kde vysvetľujú heterogenitu, ktorá bola v praxi pozorovaná u pacientov s CLL. Podľa mutačného stavu *IGHV* rozdelili pacientov na dve skupiny. Pacienti s rozdielom v nukleotidovej sekvencii oproti zárodočnej línii > 2 %, t. j. mutovaným stavom *IGHV* génu (*M-IGHV*), sú

charakteristickí miernejším priebehom ochorenia. Tento stav je považovaný za prognosticky priaznivý a definuje potenciálne indolentnú formu CLL. U pacientov s rozdielom oproti zárodočnej línii ≤ 2 %, t. j. nemutovaným stavom *IGHV* génu (*UM-IGHV*), tento stav koreluje s horšou prognózou a kratším prežívaním. Pacienti s *UM-IGHV* sú náchylní na vývin cytogenetických abnormalít alebo na tzv. Richterovu transformáciu (transformácia CLL na vyšší stupeň malignity)⁽⁶⁾. Okrem rozdielov v dĺžke prežívania boli medzi týmito dvoma skupinami pacientov pozorované rozdiely v prítomnosti nepriaznivých cytogenetických abnormalít. Nepriaznivé aberácie (del11q22-23, del17p13) sa objavujú častejšie u pacientov s *UM-IGHV*, priaznivá aberácia (samostatná del13q14) je častejšie asociovaná s *M-IGHV*⁽⁷⁾. Táto nevyvážená distribúcia len zdôrazňuje rozdielne biologické pozadie CLL podskupín s mutovaným a nemutovaným *IGHV*, ale len čiastočne vysvetľuje ich rozdielny klinický priebeh⁽⁸⁾.

Materiál a metodika

Súbor pacientov

Za obdobie 8/2015 – 2/2016 sme vyšetrili 200 pacientov s podozrením na CLL. Súbor pacientov pozostával zo 109 mužov a z 91 žien. Pacienti boli v čase diagnózy vo veku 34 – 89 rokov. Na molekulovú analýzu sme používali periférnu krv alebo kostnú dreň, ktoré boli odobraté do skúmaviek s EDTA a zároveň do skúmaviek TEMPUS. Vzorky DNA na analýzu MLPA boli izolované kitom Magnesia 16 Genomic DNA Whole Blood Kit (Anatolia Geneworks). Vzorky RNA na analýzu *IGHV* mutačného statusu boli izolované pomocou kitu Tempus Spin RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific).

IGH Somatic Hypermutation Assay

Princípom metódy je fragmentová analýza, pomocou ktorej sme identifikovali prestavby génu *IGH* (gén pre ťažký reťazec imunoglobulínu), a Sangerovo sekvenovanie, ktorým sme zisťovali mutačný status génu *IGHV*. Používali sme IGH Somatic Hypermutation Assay v2.0 – Gel Detection kit (Invivoscribe), IGH Somatic Hypermutation Assay v2.0 – ABI Fluorescence Detection kit (Invivoscribe) a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific). PCR produkty boli separované pomocou genetického analyzátoru ABI 3500 Series Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific). Fragmentovú analýzu sme vyhodnotili v softvéri GeneMapper Software 5 (ThermoFisher Scientific), na hodnotenie sekvenovania sme použili softvér Sequencing Analysis Software v6.0 (ThermoFisher Scientific). Po analýze sme sekvencie vzoriek porovnali so sekvenciami *IGHV* génu zárodočnej línie B-lymfocytov pomocou databázy IMGT/V-QUEST.

MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Chromozómové aberácie sme detegovali u pacientov metódou MLPA, ktorej princípom je hybridizácia špecifických prôb na cieľové sekvencie DNA. Používali sme kit SALSA MLPA P040 CLL probemix kit (MRC-Holland) obsahujúci sondy pre niekoľko chromozómových oblastí, ktoré majú u pacientov s CLL diagnosticky alebo prognosticky významnú úlohu: 11q22-23, chromozóm 12, 13q a 17p. PCR produkty boli separované pomocou genetického analyzátoru ABI 3500 Series

Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific), výsledky sme vyhodnotili v softvéri Coffalyser.Net Software (MRC-Holland).

Štatistická analýza

Na vyhodnotenie frekvencií mutačného statusu *IGHV* a interpretáciu vzťahu medzi výskytom chromozómových aberácií a mutačným stavom *IGHV* sme použili χ^2 test.

Výsledky

Stanovenie *IGHV* segmentu a mutačného statusu

Metódou fragmentovej analýzy sme v celom súbore pacientov stanovili klonalitu populácie B-lymfocytov. U 150 (75 %) pacientov sme preukázali monoklonálnu populáciu typickú pre CLL (**obrázok 1 (A)**), u zvyšných 50 (25 %) pacientov sme detegovali rôzne typy iných populácií (**obrázok 1 (B)**). Po stanovení klonality sme do ďalšieho skriningu zaradili 154 (77 %) pacientov, u ktorých bolo možné určiť *IGHV* segment a jeho mutačný status. Najčastejšie sa vyskytujúcim segmentom v súbore pacientov bol *IGHV1-69* prítomný u 22 (14,29 %) pacientov, a to výhradne v nemutovanom stave. Druhým najčastejšie sa vyskytujúcim segmentom bol *IGHV3-30* u 18 (11,69 %) pacientov. Všetky ostatné segmenty mali v súbore zastúpenie menej ako 10 %. Z týchto mali najvyššiu frekvenciu segmenty *IGHV3-21*, *IGHV3-7* a *IGHV4-34*, ktoré boli vo väčšine prípadov mutované. U jedného pacienta s biklonálnou populáciou B-lymfocytov bolo možné stanoviť výsledok pre oba klony: segment *IGHV1-69* v nemutovanom stave a segment *IGHV4-59* v mutovanom stave.

Detekcia chromozómových aberácií

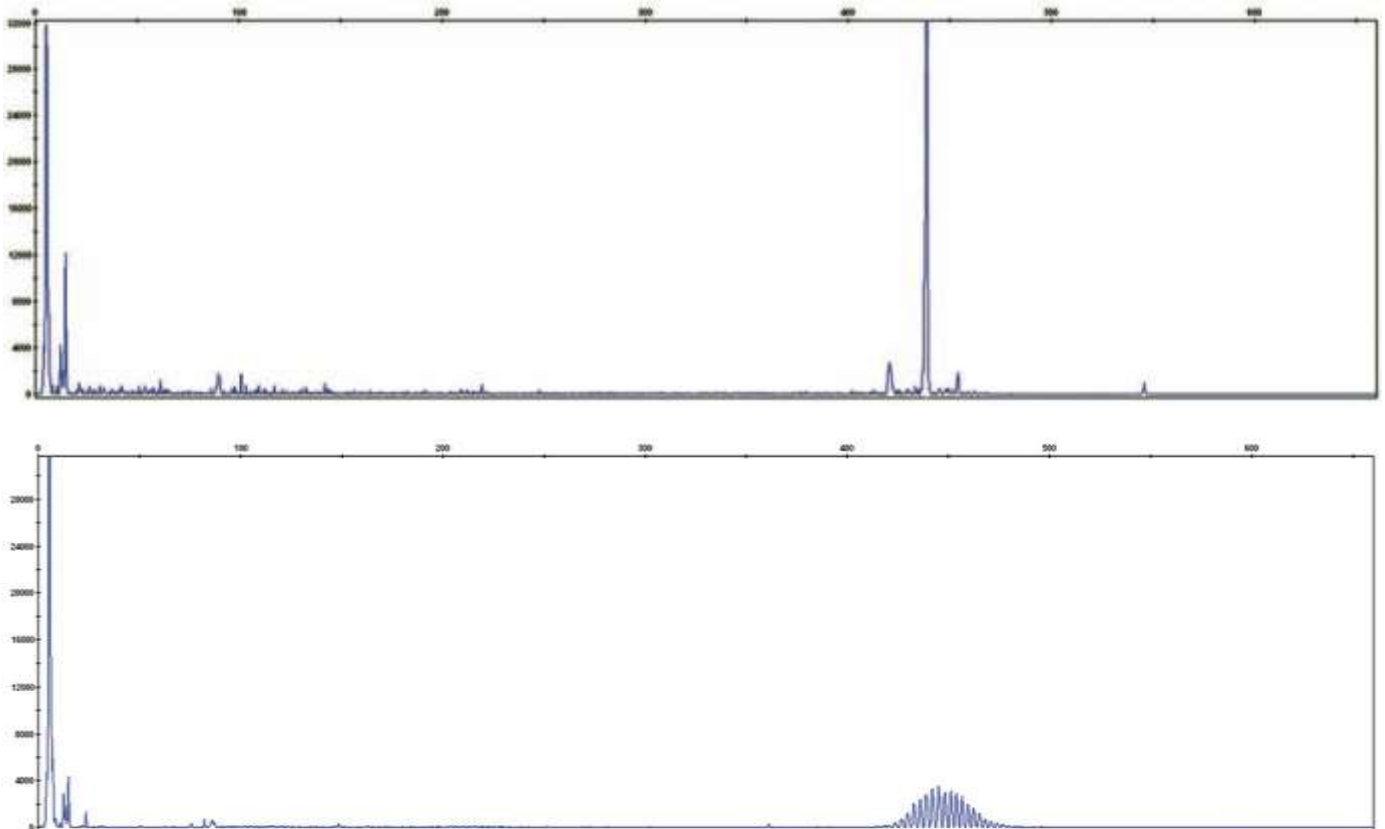
U pacientov sa chromozómové aberácie vyskytovali samostatne aj v rôznych kombináciách. U 79 (39,5 %) pacientov sme nedetegovali žiadnu aberáciu. Najväčšiu frekvenciu výskytu sme zaznamenali pri del13q14, a to celkovo u 85 (42,5 %) pacientov. Delécia sa najčastejšie vyskytovala samostatne, a to v 58 (68,24 %) prípadoch. Druhou najfrekvenciovanejšou aberáciou bola del11q22-23, ktorú sme detegovali u 27 (13,5 %) pacientov. Parciálnu trizómiu 12 (**obrázok 2**) sme zaznamenali u 23 (11,5 %) pacientov. Najmenej početnou zo sledovaných aberácií bola del17p13 detegovaná u 10 (5 %) pacientov. V 3 (1,5 %) prípadoch sme pozorovali prítomnosť 3 aberácií súčasne. U 7 (3,5 %) pacientov bol výsledok neinformatívny.

Diskusia

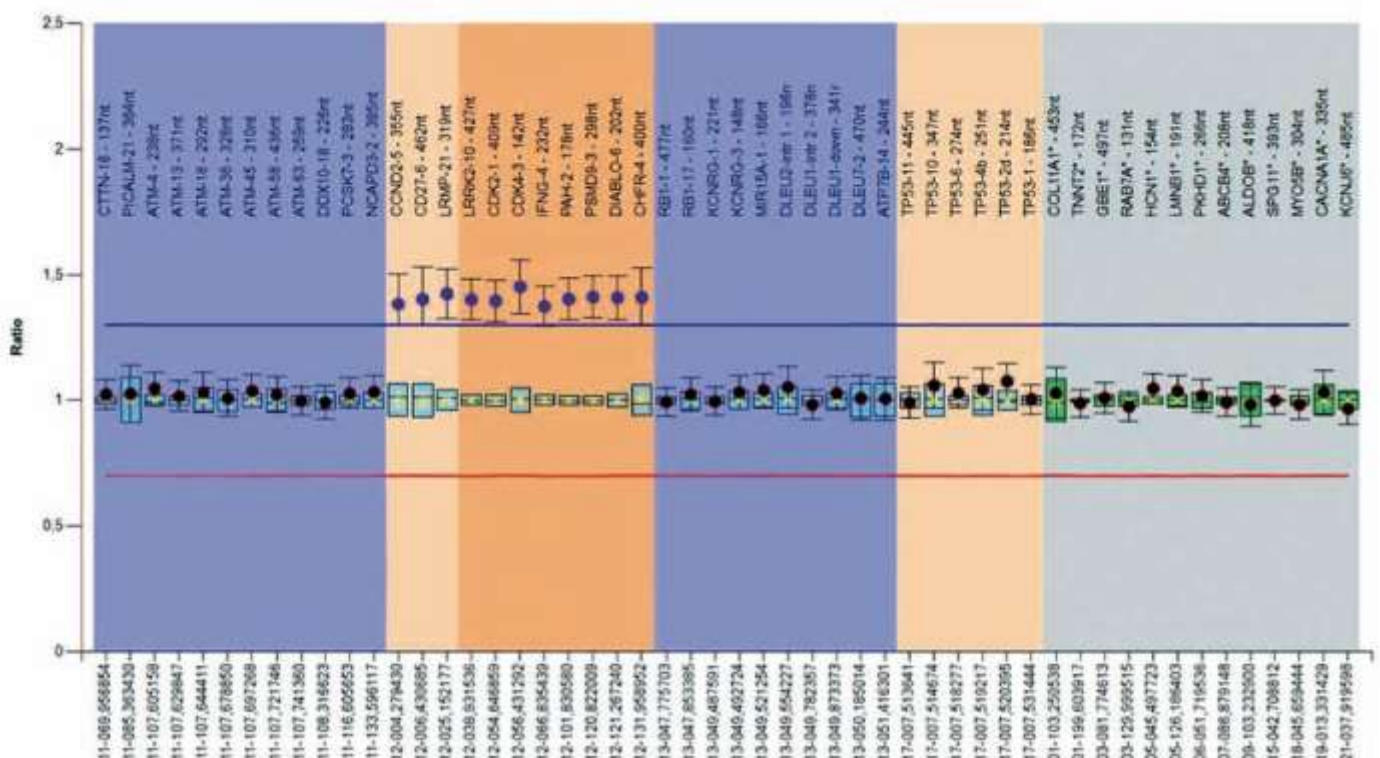
Klinický obraz CLL vyznačujúci sa stabilným priebehom ochorenia bez potreby liečebnej intervencie alebo, naopak, s vysokou početnosťou relapsov vyžadujúcich opakovanú terapiu je preukázateľne ovplyvnený výskytom genetických zmien v bunkách CLL. Hoci žiadna konkrétna genetická abnormalita nebola identifikovaná ako príčina vzniku CLL, ochorenie je charakteristické prítomnosťou molekulovogenetických markerov, na základe ktorých je možná stratifikácia pacientov do prognostických skupín a individuálny terapeutický prístup.

Polyklonalita populácie B-lymfocytov u zdravého jedinca je dôsledkom rôznorodej dĺžky preskupených génov *IGHV*. U pacienta s CLL je táto rôznorodosť z veľkej časti narušená, preto je pre CLL typická monoklonálna populácia, pri ktorej jeden klon úplne potlačil ostatné klony. Prítomnosť

Obrázok 1. Výsledky fragmentovej analýzy na určenie klonality populácie B-lymfocytov: (A) monoklonálna populácia, v ktorej je majoritný klon reprezentovaný jediným pikom, (B) polyklonálna populácia, v ktorej píky reprezentujúce jednotlivé klony vytvárajú typický obraz Gausovej krivky



Obrázok 2. Výsledok analýzy MLPA pacienta pozitívneho na amplifikáciu 12q13 (duplikovaný úsek reprezentujú príoby vyznačené modrou farbou vystúpené nad modrou líniou)



takejto populácie sme dokázali u 75 % pacientov. Polyklonálnu populáciu sme identifikovali u 16 % pacientov, u ktorých nebolo možné potvrdiť diagnózu CLL. V takýchto prípadoch je nutné kritické posúdenie nálezu a s odstupom času realizovať dodatočné vyšetrovania na stanovenie definitívnej diagnózy. U 3 % pacientov sme dokázali polyklonálnu populáciu, v ktorej mal jeden klon výrazné zastúpenie, a u jedného pacienta sme zistili dva prevažujúce klony. Prítomnosť polyklonálnej populácie, v ktorej pôvodne minoritný klon získal rastovú výhodu, sme považovali za znak subklonálnej selekcie. U takýchto pacientov je dôležitá stratégia „watch-and-wait“, teda pacienta dôkladne sledovať a časom vyšetrenia zopakovať na detekciu progresu ochorenia.

U 5 % pacientov sme detegovali biklonálnu populáciu. Takéto prípady sú zriedkavé a nie veľmi dobre charakterizované. Bolo navrhnutých niekoľko príčin, kedy u pacienta s CLL môže byť detegovateľná viac ako jedna *IGH* prestavba. Bunky CLL môžu exprimovať dva rôzne receptory BCR (B cell receptor), a teda sekretovať dva typy protilátok. Takéto bunky označujeme ako dvojnásobne produktívne (HCDP, heavy chain double productive)⁽⁹⁾. Druhou z možností je, že pacienti majú dve *IGH* prestavby detegovateľné pomocou PCR, ale iba jedna je produktívna a translatovaná do imunoglobulínu⁽¹⁰⁾. Ďalším možným vysvetlením biklonálneho modelu je, že v krvi pacienta sú naozaj prítomné dva malígne klony so samostatným pôvodom, pričom každý exprimuje iný imunoglobulín. V tomto prípade ide o pravú biklonálnu leukémiu⁽¹¹⁾. Vysoký výskyt atypických modelov poukázal na dôležitosť vyšetrenia klonality nádorovej populácie u CLL suspektných pacientov.

Somatické mutácie génu *IGHV* sú prítomné asi v polovici prípadov CLL⁽⁸⁾. Nemutované CLL bunky pravdepodobne pochádzajú z B-lymfocytov, ktoré podstúpili antigénovú stimuláciu až po malígnej transformácii. Zachovávajú si reaktivitu na antigén, dôsledkom čoho je ich vysoká proliferačná aktivita. Naopak, mutované bunky CLL prešli malígnou transformáciou až po stimulácii antigénom, nemajú zachovanú signálnu kapacitu BCR receptora a prognóza je priaznivejšia⁽¹²⁾. *IGHV* segment a mutačný status bolo možné určiť u 77 % pacientov. U jedného pacienta s biklonálnou populáciou bolo možné stanoviť dva výsledky, celkovo sme teda analyzovali 154 pacientov, ale 155 segmentov (**graf 1**). Až 52,26 % segmentov nevykazovalo somatickú hypermutáciu, 47,74 % segmentov bolo v mutovanom stave. V porovnaní so svetovými štúdiami bola frekvencia mutovaných a nemutovaných *IGHV* génov rovnaká ako v populácii Spojených štátov (53 % *UM-IGHV*, 47 % *M-IGHV*)⁽¹³⁾. Celkovo sme zaznamenali 29 typov segmentov, pričom až 14 typov patrilo do génovej rodiny *IGHV3*. Z celkového počtu 155 identifikovaných génov tvorili segmenty tejto génovej rodiny až 52,26 % prípadov. *IGHV3* je vo všeobecnosti najrozšírenejšou génovou rodinou, čo potvrdzujú viaceré európske i svetové štúdie.

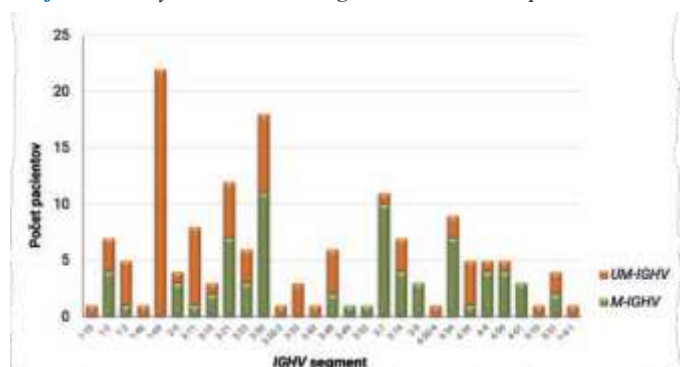
Najčastejšie sa vyskytujúcim segmentom v súbore bol *IGHV1-69* prítomný u 14,29 % pacientov a vyskytoval sa výhradne v nemutovanom stave. Veľmi podobná frekvencia bola reportovaná v populácii Švédska, kde bol tento segment tiež najfrekvencovanejší a rovnako sa vyskytoval výhradne v nemutovanom stave⁽¹⁴⁾. Druhým najčastejším génom bol *IGHV3-30* zaznamenaný u 11,69 % pacientov, z toho u 61,11 % prípadov mutovaný. Segment bol tiež často reportovaný v oblasti Stredozemného mora⁽¹⁵⁾. *IGHV3-30* je vo

väčšine oblastí asociovaný s mutovaným stavom. Prítomnosť segmentu *IGHV3-21* sme stanovili u 7,79 % prípadov. Preferenčne sa vyskytoval mutovaný, a to u 58,33 % pacientov. *IGHV3-21* je asociovaný s horšou prognózou bez ohľadu na mutačný status⁽¹⁶⁾. Najvyššia prevalencia génu bola publikovaná v Škandinávii (11,2 %), kde sa vyskytoval prevažne v mutovanom stave⁽¹⁴⁾. Naopak, v populáciách južnej Európy (Francúzsko, Grécko, Taliansko, Španielsko) je výskyt *IGHV3-21* značne nižší (2,9 %) a nižšia je aj prítomnosť somatickej hypermutácie⁽¹⁵⁾. Rozdiely vo výskyte jednotlivých génov *IGHV* pravdepodobne reflektujú nielen variácie v genetickom pozadí CLL, ale aj leukemickú variabilitu dependentnú od geografickej polohy⁽¹⁷⁾. Tieto rozdiely tiež môžu znamenať, že prestavby *IGH* génu kódujú špecifický epitop, na ktorý sa viaže neznámy antigén a stimuluje proliferáciu B-lymfocytov⁽¹⁴⁾.

Napriek relatívnej genómovej stabilite buniek CLL sa až u 80 % pacientov vyskytujú chromozómové aberácie. Vo všeobecnosti majú pacienti s *del17p13* a *del11q22-23* horšiu prognózu a kratšie prežívanie, pretože narúšajú expresiu tumor-supresorových génov *TP53* a *ATM*. Prítomnosť *del13q14* má pri samostatnom výskyte priaznivý prognostický charakter a prognostický význam trizómie 12 je sporný⁽³⁾. Prítomnosť aberácií sme dokázali u 57 % pacientov. U 39,5 % pacientov sme nedetegovali žiadnu abnormalitu a v 3,5 % prípadov nebolo možné výsledky vyhodnotiť. Ak by sme vyhodnotili len 168 pacientov, u ktorých sme potvrdili plne vyvinutú CLL (prípady s monoklonálnou populáciou) alebo vyvíjajúcu sa CLL (prípady s atypickým modelom populácie), prítomnosť aberácie by sme detegovali u 64,88 % pacientov. Dané výsledky neboli v súlade s publikovanými údajmi iných štúdií, ale boli značne nižšie. Nemecké štúdie uvádzajú frekvenciu chromozómových abnormalít 82 – 85,2 %^(3,18), frekvencia vo Veľkej Británii je 69 %⁽¹⁹⁾ a v USA 72,5 %⁽²⁰⁾. Uvedený rozdiel mohol byť ovplyvnený viacerými faktormi, napr. kompozíciou a veľkosťou súboru, rozdielmi v indikačných kritériách či metodickými rozdielmi.

U 12,5 % pacientov sme neidentifikovali žiadnu aberáciu a súčasne sme pozorovali polyklonálny model populácie. Takíto pacienti nevykazujú žiadne základné molekulovogenetické znaky rozvíjajúceho sa ochorenia CLL. Normálny karyotyp sme pozorovali aj v 24 % prípadov s monoklonálnou populáciou, čo je priaznivý prognostický znak. U pacientov s atypickým modelom populácie (polyklonálna s jedným alebo dvoma prevažujúcimi klonmi, biklonálna, triklonálna,) sme nezaznamenali asociáciu so žiadnou špecifickou aberáciou.

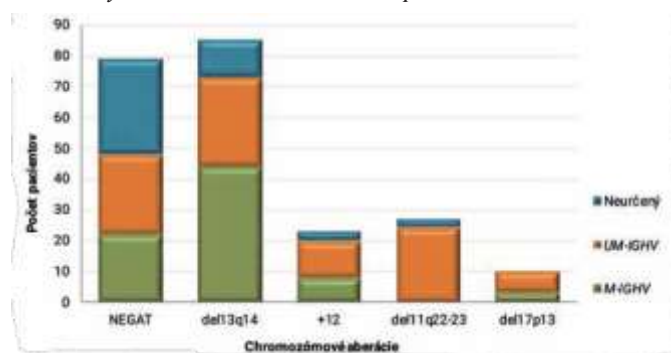
Graf 1. Mutačný status *IGHV* segmentov v súbore pacientov



Najväčšiu frekvenciu výskytu sme zaznamenali pri del13q14, a to celkovo u 42,5 % pacientov. Delécia sa najčastejšie vyskytovala samostatne, a to u 68,24 % pacientov. Prevalencia a samostatný výskyt boli najviac podobné stavu v USA (62 %)⁽²⁰⁾. Pre pacientov predstavuje samostatný výskyt tejto aberácie priaznivú prognózu. U 31,76 % pacientov bola pozorovaná spolu s niektorou ďalšou aberáciou a jej priaznivý prognostický význam sa strácal. Del13q14 bola jedinou aberáciou, ktorú sme dokázali u pacientov s polyklonalitou B-lymfocytov. Vysvetlením tohto faktu môže byť, že delécia postihuje gény *MIR15A* a *MIR161* kódujúce miRNA, ktorých úlohou je negatívna regulácia génu *BCL2* (B cell lymphoma 2) na posttranskripčnej úrovni. Pri delécii týchto génov dochádza k zvýšenej expresii antiapoptického proteínu Bcl2, čo môže spôsobovať perzistentnú lymfocytózu aj u pacientov s polyklonálnou populáciou. Druhou najfrekventovanejšou aberáciou bola del11q22-23, ktorú sme detegovali u 13,5 % pacientov. Prevalencia delécie bola podobná Nemecku (12 %)⁽¹⁸⁾. Bunky CLL s del11q22-23 sú náchylnejšie na vznik ďalších genetických aberácií⁽⁵⁾. Prítomnosť parciálnej trizómie 12 sme zaznamenali u 11,5 % pacientov a jej výskyt bol v súlade s frekvenciou u nemeckých pacientov (13,6 %)⁽¹⁸⁾. Trizómia 12 je považovaná za marker s intermediárnou prognostickou hodnotou⁽³⁾. Najmenej početná zo sledovaných aberácií bola del17p13, detegovaná u 5 % pacientov. Výskyt delécie sa zhoduje s britskou (6 %)⁽¹⁹⁾ a nemeckou populáciou (7 %)⁽¹⁸⁾. Bez ohľadu na prítomnosť inej aberácie je asociovaná s veľmi agresívnym priebehom ochorenia, pretože narúša expresiu génu *TP53*⁽³⁾. U 1,5 % pacientov sme zaznamenali prítomnosť 3 aberácií súčasne, čo je indikátorom agresívneho priebehu ochorenia. Nižšiu frekvenciu chromozómových abnormalít v porovnaní so zahraničnými štúdiami pripisujeme ich zachyteniu v raných štádiách ochorenia. Neprítomnosť aberácie sa však môže časom zmeniť v dôsledku klonálnej evolúcie buniek CLL.

V súbore pacientov sme tiež sledovali vzájomný vzťah mutačného statusu *IGHV* s výskytom chromozómových aberácií (graf 2). Zo 79 pacientov negatívnych na chromozómové aberácie sme v 32,91 % prípadov stanovili nemutovaný stav *IGHV*, u 27,85 % pacientov stav mutovaný. U 39,24 % negatívnych pacientov s polyklonálnou, biklonálnou a triklonálnou populáciou sme mutačný status neurčovali. Vzhľadom na rovnomerné percentuálne zastúpenie jednotlivých kategórií sme neidentifikovali žiaden preferenčný mutačný status. Del13q14 bola prevažne, t. j. u 51,76 % prípadov, asociovaná s *M-IGHV*. U týchto pacientov bola jedinou detegovanou aberáciou, čo potvrdzuje jej priaznivý prognostický význam. U 34,12 % pacientov sa vyskytovala v spojení s *UM-IGHV*, pričom bola u nich okrem del13q14 pozorovaná ešte aspoň jedna aberácia. Vzťah chromozómových aberácií s mutačným statusom potvrdil koreláciu prognosticky priaznivej aberácie, samostatnej del13q14, s mutovaným stavom *IGHV*. Trizómiu

Graf 2. Zastúpenie chromozómových aberácií a ich asociácia s mutačným statusom *IGHV* v súbore pacientov



12 sme pozorovali v asociácii s *UM-IGHV* u 52,17 % pacientov, v 34,79 % prípadov bola asociovaná s *M-IGHV*. Preferenčný status však nebolo možné určiť, pretože rozdiel vo frekvenciách nebol preukazný ($P = 0,0706$), čo naznačuje intermediárnu prognostickú hodnotu. Del11q22-23 sa vyskytovala výhradne u pacientov s *UM-IGHV* a nikdy sa nevyskytovala u pacientov s typickou polyklonalitou. Dosiahnuté výsledky potvrdili negatívny prognostický význam del11q22-23. Delécia 17p13 s najmenej priaznivou prognózou sme v 70 % prípadov pozorovali s *UM-IGHV*, čo potvrdzuje ich koreláciu. Mutačný status tiež súvisel s počtom chromozómových abnormalít. U 28 pacientov sme detegovali prítomnosť dvoch a viacerých aberácií, z toho 67,88 % prípadov bolo asociovaných s nepriaznivým nemutovaným stavom *IGHV*. Pozorovaný vzťah chromozómových aberácií s mutačným statusom potvrdil prognostickú koreláciu a výsledky boli v súlade so štúdiami z Nemecka⁽¹⁸⁾ či Veľkej Británie⁽¹⁹⁾.

Záver

V súčasnosti je hlavným vedeckým cieľom analýzy prognostických markerov nájsť genetické vysvetlenie klinickej heterogenity CLL. Molekulovogenetické parametre, ako je mutačný status *IGHV* a chromozómové aberácie, boli úspešne zavedené do klinickej praxe. V predloženej štúdii sme preukázali, že stav týchto parametrov v slovenskej populácii je intermediárny, pretože so žiadnou zo zahraničných štúdií sa nezhodoval úplne. Naznačuje to nielen genetické pozadie ochorenia, ale aj existenciu environmentálneho antigénového tlaku na selekciu B-lymfocytov. Výsledkom správnej detekcie a interpretácie prognostických faktorov je skorá stratifikácia pacientov do prognostických skupín pre voľbu vhodnej therapeutickej stratégie a následné zlepšenie klinickej starostlivosti.

Podakovanie

Moja vďaka patrí všetkým kolegom, ktorí sa podieľali na príprave a vyhodnocovaní vzoriek pacientov vyšetřovaného súboru.

LITERATÚRA

- Rodríguez D, Bretones G, Arango JR., et al. Molecular pathogenesis of CLL and its evolution. *International Journal of Hematology* 2015; 101(3): 219-228.
- Balhárek T, Barthová M, Szépe P, et al. Komentár k vývoju konceptu prognostických faktorov chronickej lymfocytovej leukémie: Cesta od prognostických faktorov k prediktorom liečebnej odpovede. *Klinická Onkologie* 2009; 22(6): 254-263.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343(26): 1910-1916.
- Cuneo A, Cavazzini F, Ciccone M, et al. Molecular cytogenetic lesions in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Meeting Reports* 2009; 3(3): 86-90.

5. Copáková L, Piačková B, Leitnerová M. Význam delécie a mutácie génu TP53 a ďalších prognostických markerov u pacientov s CLL. *Onkológia* 2014; 9(2): 100-103.
6. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(6): 1840-1847.
7. Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100(4): 1410-1416.
8. Rodríguez-Vicente AE, Díaz MG, Hernández-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genetics* 2013; 206(3): 49-62.
9. Kalmanovich G, Mehr R. Models for antigen receptor gene rearrangement. iii. heavy and light chain allelic exclusion. *The Journal of Immunology* 2003; 170(1): 182-193.
10. Buc M. *Imunológia*. Bratislava: Veda 2001; 463 pp.
11. Chang H, Cerny J. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia with two distinct cell populations: Evidence for separate clonal origins. *American Journal of Clinical Pathology* 2006; 126(1): 23-28.
12. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, et al. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118(16): 4313-4320.
13. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2004; 351(9): 893-901.
14. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatic mutated IgVH3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99(6): 2262-2264.
15. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; 105(4): 1678-1685.
16. Dal-Bo M, Del Giudice I, Bomben R, et al. B-cell receptor, clinical course and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia: the growing saga of the IGHV3 subgroup gene usage. *British Journal of Haematology* 2011; 153(1): 3-14.
17. René C, Prat N, Thuizat A, et al. Comprehensive characterization of immunoglobulin gene rearrangements in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2014; 18(6): 979-990.
18. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV_H status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007; 21(12): 2442-2451.
19. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100(4): 1177-84.
20. Nelson BP, Gupta R, Dewald GW, et al. Chronic lymphocytic leukemia FISH panel: impact on diagnosis. *American Journal of Clinical Pathology* 2007; 128(2): 323-332.



Mgr. Erika Tomková

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: erika.tomkova@medirex.sk



BIOG
MEDICÍNSKA TECHNIKA

