pfiedloha 1/11/07 3:06 PM Str. 232
proLékaře.cz | 31.10.2026

Analýza rizikových faktorů u 248 pacientů s chronickou B-lymfocytární leukemií vyšetřených v době diagnózy

Cmunt E.[1], Trněný M.[1], Karban J.[1], Šálková J.[1], Michalová K.[2], Zemanová Z.[2], Pavlištová L.[2], Schwarz J.[3], Peková S.[3]

[1]I. interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha, [2]Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK, Praha, [3]Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Souhrn

Na souboru 248 pacientů (139 mužů a 109 žen) s chronickou B-lymfocytární leukemií v době diagnózy byl analyzován výskyt klinického stadia, exprese CD38, ZAP-70, cytogenetických změn (metodou FISH) a mutačního stavu IgV_H a jejich význam pro celkovou dobu přežívání. Ve stadiu Rai 0 a I bylo 203 pacientů (82,9 %), ve stadiu II 25 nemocných (10,2 %) a ve stadiu III a IV 17 pacientů (7,0 %). Exprese CD38 byla vyšetřena u 137 nemocných (55,2 % z celkového počtu), pozitivní byla u 49 pacientů (35,8 %), negativní u 88 (64,2 %). Exprese ZAP-70 byla vyšetřena u 109 nemocných (44 % z celkového počtu), pozitivní byla u 44 pacientů (40,4 %), negativní u 65 (59,6 %). Z celkem 160 vyšetření mutačního stavu IgV_H (64,5 % celého souboru) bylo 71 (44,4 %) nemutovaných a 89 případů (55,6 %) mutovaných. Trizomie chromozomu 12 byla prokázána ve 22 případech (11,5 %), jednou byl nález hodnocen jako hraniční (0,5 %) ze 192 vyšetřených pacientů (77,4 % celého souboru), delece 13(q14) byla prokázána ve 107 případech (56,6 %) ze 189 vyšetřených (76,2 % celého souboru), delece 11(q23) byla nalezena ve 4 případech (12,9 %) z 31 vyšetřených (12,5 % celého souboru), delece 11(q22.3) byla prokázána ve 13 případech (16,5 %) ze 79 vyšetřených (31,9 %) a delece 17(p13) u 22 nemocných (11,4 %) z 193 vyšetřených (77,8 %). Z celkového souboru zemřelo 48 pacientů (19,4 %), celkové přežívání v 5 letech bylo 83,5 %, v 10 letech 58,2 %. Jako prognosticky významné rizikové faktory se při námi provedené analýze prokázaly pohlaví (p = 0,0002), klinické stadium dle Raie (p = 0,0002), mutační stav IgV_H (p = 0,0001), delece 17(p13) (p = 0,09), exprese CD38 (p = 0,05) a ZAP-70 (p = 0,02).

Klíčová slova: B-chronická lymfocytární leukemie, prognóza, imunofenotypizace, cytogenetika (FISH), mutační stav IgV_H

Summary

Cmunt E., Trněný M., Karban J., Šálková J., Michalová K., Zemanová Z., Pavlištová L., Schwarz J., Peková S.: The risk factors analysis in 248 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia at diagnosis

248 patients (139 men and 109 women) with B-cell chronic lymphocytic leukemia were evaluated at diagnosis with respect of clinical stage, CD38 and ZAP-70 expression, cytogenetic changes (by FISH method) and IgV_H mutation status and impact of these for overall survival. 203 patients (82,9 %) were in Rai 0 and I clinical stage, 25 patients (10,2 %) were in stage II and 17 patients (7,0 %) were in stage III and IV. CD38 expression was evaluated at 137 patients (55,2 %), positive was at 49 patients (35,8 %), negative was at 88 (64,2 %) patients. ZAP-70 expression was evaluated in 109 patients (44 % from the total number), positive was in 44 patients (40,4 %), negative in 65 (59,6 %) patients. From 160 evaluations of IgV_H mutation status (64,5 % of the total number of patients) 71 (44,4 %) patients were non-mutated and 89 (55,6 %) cases were mutated. From 192 evaluated patients (77,4 % of the total number of patients) trisomy of 12 chromosome was present in 22 patients (11,5 %), one case was borderline (0,5 %), 13(q14) deletion was present in 107 cases (56,6 %) out of 189 evaluated (76,2 % of the total number of patients), 11(q23) deletion was found in 4 cases (12,9 %) out of 31 evaluated (12,5 % of the total number of patients), 11(q22.3) deletion was present in 13 cases (16,5 %) out of 79 evaluated (31,9 %) and 17(p13) deletion by 22 patients (11,4) out of 193 evaluated (77,8 %). 48 patients died (19,4 %), overall survival in 5 years was 83,5 %, in 10 years 58,2 %. According to our analysis sex (p=0,0002), Rai clinical stage (p=0,0002), IgV_H mutation status (p=0,0001), 17(p13) deletion (p=0,09), CD38 (p=0,05) and ZAP-70 expression (p=0,02) revealed to be significant prognostic risk factors.

Key words: B-cell chronic lymphocytic leukemia, prognosis, imunophenotyping, cytogenetics (FISH), IgV_H mutation status

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 4, 232–239.

Úvod

Chronická lymfocytární leukemie B typu (B-CLL) je nejčastější formou leukemie u dospělých v Evropě a Severní Americe, kde tvoří cca 25 % všech leukemií na rozdíl od pouze cca 5 % případů na východní polokouli. Průměrná incidence je v literatuře udávána cca 2,5/100 000 obyvatel (1). Skutečnou incidenci B-CLL je obtížné přesně stanovit, protože pacienti mohou býti v době náhodné diagnózy asymptomatičtí. V posledních 20 letech se procento B-CLL diagnostikovaných v asymptomatickém stadiu zvýšilo z 30 % na 60 % zřejmě i v důsledku vyššího počtu prováděných vyšetření krevního obrazu z jiných důvodů, např. chirurgické předoperační vyšetření (2), preventivní prohlídky. Zdá se, že přibývají spíše méně agresivní formy onemocnění (3).

U B-CLL jsou k určení klinického stadia nejčastěji

pfiedloha 1/11/07 3:06 PM Str. 233
proLékaře.cz | 31.10.2026

užívány Raiův (4) a Binetův systém (5). Ani jeden z těchto systémů neodlišuje v časném stadiu přesně pacienty, u kterých lze předpokládat progresi, od těch, jejichž choroba bude zřejmě probíhat indolentně.

V posledních několika letech byly objeveny některé dalších znaky, které umožňují odhadnout, jak se bude choroba vyvíjet – například hladina β-2-mikroglobulinu, laktátdehydrogenázy (LDH), sérové thymidinkinázy (sTk) (6), tumor necrosis faktoru (TNF), terminální deoxynukleotidyltransferázy (TdT), typ infiltrace kostní dřeně a další. Zavedením fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) do rutinní praxe byly objeveny cytogenetické změny: delece 13q14, trisomie 12, delece 17p13.1 (nádorový supresorový gen p53) a delece 11q23, které se klasickým cytogenetickým vyšetřením nedají zjistit (7–9).

Svým způsobem převratným se v současné době zdá objev vlivu stavu mutace genu pro těžké řetězce imunoglobulinů(IgV_H), kde je prokázaný vliv na celkovou dobu přežití (10, 11). V případě mutovaného stavu bývá většinou průběh choroby stabilizovaný, zatímco nemutovaný stav bývá spojen s relativně špatnou prognózou. Současně s tímto objevem byl popsán význam exprese CD38 (≥ 30 %) (11–13), později ZAP-70 (≥ 20 %) (14, 15). Současné zastoupení posledně jmenovaných rizikových faktorů je sice časté, ale nikoliv stoprocentní. Nejnověji pak byl popsán význam HLA-G exprese (16).

Tab. 1. Přehled nejdůležitějších rizikových faktorů u B-CLL.

• Mutační stav IgV_H
• Exprese ZAP-70, CD38
• Hladina LDH, sTk, bbb-2-mikroglobulinu
• „Lymphocyte doubling time“
• Cytogenetické změny (delece 17p13, delece 11q, trisomie 12, delece 13q14)
• Typ infiltrace dřeně (difuzní x non-difuzní)
• Klinické stadium (Rai, Binet)
• (Exprese HLA-G)

Zavedením purinových analog a monoklonálních protilátek byl zaznamenán určitý pokrok v prodloužení celkového přežívání pacientů s B-CLL, ale i tak B-CLL je i nadále při použití konzervativní léčby zřejmě nevyléčitelnou nemocí (17, 18). Rozhodnutí, kdy a jakým způsobem zahájit léčbu, zůstává velmi důležitým hlavně u mladších pacientů s přítomností rizikových faktorů a tedy předpokládaným, ale nikoliv jistým agresivnějším průběhem nemoci. Řádně a včasně indikovaná alogenní transplantace by mohla vést k vyléčení, ale na druhou stranu je zatím zatížena relativně vysokým rizikem (peritransplantační mortalita).

Cílem naší studie bylo zjištění možnosti určení prognózy u pacientů s B-CLL v době diagnózy při použití moderních diagnostických metod. Přesnější prognóza by měla mít vliv nejen na rozhodování, zda léčbu začít, ale i na rozhodnutí léčebné strategie. Studie navazuje na dřívější analýzy, které byly provedeny na menším souboru nemocných, u kterých byly vyšetřeny jen některé prognostické faktory.

Pacienti a metodika

Retrospektivní analýza se zaměřila na nemocné diagnostikované a sledované v hematologických ambulancích I. interní kliniky VFN v Praze. Pro zařazení do analýzy byla podmínkou dostupnost následujících údajů: datum diagnózy, klinické stadium dle Raie v čase diagnózy, datum poslední kontroly a stav při posledním sledování (zda nemocný žije či zemřel) a dále alespoň jeden z následujících údajů: vyšetření imunofenotypizace – exprese CD 38 či ZAP-70, cytogenetické vyšetření pomocí FISH, vyšetření mutačního stavu IgV_H. Vyšetření byla u většiny pacientů provedena v čase stanovení diagnózy, nebylo to však podmínkou (některá vyšetření jsou prováděna až v posledních letech a v době diagnózy tedy nebyla dostupná). U nemocných nebylo sledováno podání terapie ani její typ.

Kritéria pro stanovení diagnózy byla v souladu s obecně přijímaným doporučením (19). Pro stanovení klinického stadia byla použita kritéria dle Raie (4).

Imunofenotypizace

Znaky CD38 a ZAP-70 byly detekovány na B lymfocytech (CD19+) periferní krve nabírané do K_3EDTA. Povrchový znak CD38 byl prokazován metodou dvojbarevného značení s použitím kombinace monoklonálních protilátek (MoAb): CD 19 – FITC (Fluorescein isothocyanat) / CD38- PE (Phycoerythrin). Jako negativní kontrola sloužil vzorek značený isotypovými protilátkami (IgG_1) s navázaným FITC a PE.

V případě vyšetřování cytoplazmatického znaku ZAP-70 byla použita trojkombinace MoAb: CD3-FITC / ZAP-70 – PE / CD19 – PC-5 (Phycoerythrincyanin-5). ZAP-70 byl prokazován intracelulárně. Nezbytná permeabilizace buněk, umožňující průnik protilátky do buňky, byla prováděna pomocí kitu Intra-Prem™ (Immunotech). Permeabilizaci buněk předcházelo povrchové značení protilátkami anti-CD3 a anti-CD19. Hranice pozitivity byla v tomto případě nastavována podle „pozitivní kontroly“, tj. podle T-lymfocytární populace (CD3+), která je ZAP-70 pozitivní. Kromě protilátky anti-ZAP-70 (Caltag) byly používány protilátky Immunotech.

Připravené vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton-Dickinson). K načítání a hodnocení dat byl používán software SimulSET™, v případě detekce ZAP-70 software CELLQuest™. Znak CD38 byl hodnocen v gatu na lymfocyty, v tomto případě byl proveden přepočet CD38+ B-buněk na 100 % B-lymfocytů. Znak ZAP-70 byl hodnocen v gatu na B-lymfocyty, Výsledky vyjadřovaly procentuální podíl B-buněk se sledovaným znakem (CD38, ZAP-70) v celkovém počtu B-lymfocytů.

pfiedloha 1/11/07 3:06 PM Str. 234
proLékaře.cz | 31.10.2026

Cytogenetická vyšetření

Cytogenetické vyšetření bylo prováděno u většiny pacientů z periferní krve, u některých z kostní dřeně; již dříve bylo zjištěno, že tyto výsledky jsou srovnatelné (20, 21). Vzorky kostní dřeně byly zpracovány po 24hodinové kultivaci bez použití mitogenu podle standardních cytogenetických postupů, vzorky periferní krve byly zpracovány bez kultivace a použity pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH).

Část nemocných byla vyšetřena kombinací jednotlivých DNA sond (Abbott-Vysis™): sonda D13S319 pro oblast 13q14 byla použita v kombinaci se sondou CEP 12 pro centromeru chromozomu 12. Delece genu p53 byla vyšetřena „lokus specifickou" sondou LSI p53 v kombinaci s centromerickou CEP 17 jako kontrolou. Pro delece dlouhých ramen chromozomu 11 byla použita sonda „lokus specifická" pro gen MLL (oblast 11q23), později sonda LSI ATM (oblast 11q22.3) s centromerickou CEP 11 jako kontrolní. Hranice významnosti pozitivního FISH nálezu (cut-off level) byla stanovena na 2,5 % (průměr + 3SD). V posledních dvou letech byli nemocní vyšetřováni pomocí CLL Probe Panel (Abbott-Vysis™): Jeden kit obsahuje kombinaci tří DNA sond CEP12/LSI D13S319/LSI 13q34, druhý kombinaci sond LSI p53/LSI ATM. Cut-off level pro vyšetření těmito sondami byla stanovena na 5% pro delece, 2,5% pro trizomii 12. Při každém vyšetření bylo hodnoceno 200 interfázních jader.

Vyšetření mutačního stavu IgV_H

Mononukleáry z periferní krve (výjimečně z kostní dřeně), izolované na gradientu Ficoll-Paq, byly lyzovány a RNA byla izolována pomocí TriZolu (Invitrogen, KRD, Praha). RNA byla přepsána do cDNA za užití transkriptázy Superscript II (Invitrogen). cDNA byla amplifikována pomocí PCR s použitím Ampli-Taq Gold polymerázy (Applied Biosystems, Praha) v 6 oddělených reakcích pro záchyt klonální proliferace v 7 rodinách IgV_H genů. „Touch down" metodologie s použitím degenerovaných primerů byla popsána jinde (22). RT-PCR produkty byly purifikovány a sekvenovány za použití Big Dye Terminator kitu v. 3 a sekvenátoru ABI Prism 310 Genetic Analyzer (oboje od Applied Biosystems). Sekvence klonálně přestavěných IgV_H genů byly porovnány s jejich germinálními liniemi použitím softwaru IgBLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/; navštívená naposledy 30. 11. 2005). Rozhraní 2 % (tj. 98 % sekvenční homologie) rozhodovalo o tom, zda IgV_H gen byl považován za mutovaný či nemutovaný.

Statistické zpracování výsledků

Primárním cílem analýzy bylo srovnání celkového přežití podle jednotlivých předpokládaných prognostických skupin. Jako událost bylo bráno úmrtí z jakékoli příčiny. Nebyla analyzována skutečnost, zda a případně čím byl nemocný léčen.

Pro statistické zpracování byla použita konstrukce křivek přežití podle Kaplan-Maiera (23) a pro porovnání log rank test za použití programu GraphPad Prism. Za statisticky významný byl brán rozdíl na hladině významnosti nižší než 0,05. V rámci skupin byla vždy analyzována skupina vyšetřených proti nevyšetřeným a poté skupina s pozitivním znakem proti skupině se znakem negativním.

Výsledky

Soubor

Celkem bylo analyzováno 248 nemocných, u nichž byla v rozmezí let 1975 až 2005 stanovena diagnóza B-CLL. Jednalo se o 139 mužů a 109 žen s věkovým mediánem 64 let (35–90). Klinické stadium podle Raie bylo určeno u 245 nemocných; více než tři čtvrtiny nemocných tvořili nemocní ve stadiích 0 a I (n = 203, 82,9 %), ve stadiu II bylo při stanovení diagnózy 25 nemocných (10,2 %) a ve stadiu III a IV pouze 17 nemocných (7,0 %).

Na přítomnost znaku CD38 bylo vyšetřeno 137 nemocných, při stanovení hranice pozitivity 30 % buněk bylo hodnoceno 49 (35,8 %) B-CLL jako pozitivních a 88 (64,2 %) jako negativních. Při stanovení hranice 20 % buněk pozitivních bylo 55 (40,1 %) a negativních 82 (59,9 %). Na přítomnost znaku ZAP-70 bylo vyšetřeno 109 nemocných (44 % z celkového počtu). Jako hranice pozitivity byla brána přítomnost znaku na 20 a více procentech buněk. ZAP-70 pozitivních bylo 44 pacientů (40,4 %) a negativních 65 (59,6 %).

Při hodnocení mutačního stavu IgV_H byla hranice, dělící jednotlivé případy na mutované a nemutované, 98 % – ze 160 vyšetřených případů (64,5 % z celého souboru) bylo hodnoceno 89 (55,6 %) jako mutovaných a 71 (44,4 %) jako nemutovaných.

Vyšetření pomocí FISH bylo provedeno celkem u 196 pacientů (79,0 %).

Přítomnost trizomie chromozomu 12 byla vyšetřena u 192 pacientů (77,4 %), z nichž byla trizomie nalezena ve 22 případech (11,5 %) a jednou (0,5 %) byl nález hodnocen jako hraniční, u 169 pacientů (88 %) trizomie 12 nebyla prokázána.

Vyšetření delece chromozomu 13q14 –Rb1 gen bylo provedeno u 189 pacientů (76,2 %), z toho byla delece nalezena u 107 případů (56,6 %), jako hraniční nález to bylo u 6 pacientů (3,2 %) a bez přítomnosti delece bylo 76 případů (40,2 %).

Vyšetření delece 11q23 – MLL gen – bylo provedeno u 31 pacientů (12,5 %), delece byla nalezena ve 4 případech (12,9 %), jednou byl případ hodnocen jako hraniční a 26 jako negativní (83,9 %).

Na přítomnost delece 11q22.3 – ATM gen – bylo vyšetřeno 79 pacientů (31,9 %). Delece byla nalezena ve 13 případech z vyšetřených (16,5 %) a v 66 případech (83,5 %) byl nález normální, tj. ATM alely byly přítomny na obou chromozomech.

Vyšetření delece 17p13 bylo provedeno u 193 pacientů (77,8 %). Pozitivní nález, tj. chybění jedné alely p53 genu, byl zaznamenán u 22 nemocných (11,4 %), jako

pfiedloha 1/11/07 3:06 PM Str. 235
proLékaře.cz | 31.10.2026

Tab. 2. Soubor nemocných.

n	248	
mužů/žen	139/109	56 %/44 %
věk při diagnóze	64	(35–90)
klinické stadium (dle Rai et al.)		
0–I	203	(82,9 %)
II	25	(10,2 %)
III–IV	17	(7,0 %)
Exprese CD38+ (vyšetřeno 137 – 55,2 %)		
pozitivních při hranici 30 %	49	(35,8 %)
negativních při hranici 30 %	88	(64,2 %)
pozitivních při hranici 20 %	55	(40,1 %)
negativních při hranici 20 %	82	(59,9 %)
Exprese ZAP-70 (vyšetřeno 109 – 44 %)		
pozitivní	44	(40,4 %)
negativní	65	(59,6 %)
Mutační stav IgV_H (vyšetřeno 160 – 64,5 %)		
mutovaný	89	(55,6 %)
nemutovaný	71	(44,1 %)
Chromozomální aberace (vyšetřeno 196 – 79 %)		
Trizomie 12 (vyšetřeno 192 – 77,4 %)		
nález +12 pozitivní	22	(11,5 %)
nález +12 hraniční (rovnající se cut-off)	1	(0,5 %)
nález +12 negativní	169	(88,0 %)
del(13)(q14) (vyšetřeno 189 – 76,2 %)		
nález del(13)(q14) pozitivní	107	(56,6 %)
nález del (13)(q14) hraniční (rovnající se cut-off)	6	(3,2 %)
nález del (13)(q14) negativní	76	(40,2 %)
del(11)(q23) (vyšetřeno 31 – 12,5 %)		
nález del(11)(q23) pozitivní	4	(12,9 %)
nález del(11)(q23) hraniční (rovnající se cut-off)	1	(3,2 %)
nález del(11)(q23) negativní	26	(83,9 %)
del(11)(q22.3) (vyšetřeno 79 – 31,9 %)		
nález del(11)(q22.3) pozitivní	13	(16,5 %)
nález del(11)(q22.3) hraniční (rovnající se cut-off)	0	
nález del(11)(q22.3) negativní	66	(83,5 %)
del(17)(p13) (vyšetřeno 183 – 77,8 %)		
nález del(17)(p13) pozitivní	22	(11,4 %)
nález del(17)(p13) hraniční (rovnající se cut-off)	5	(2,6 %)
nález del(17)(p13) negativní	166	(86,0 %)

hraniční byl hodnocen v 5 případech (2,6 %) a jako negativní ve 166 případech (86,0 %).
Soubor je souhrnně popsán v tabulce 2.

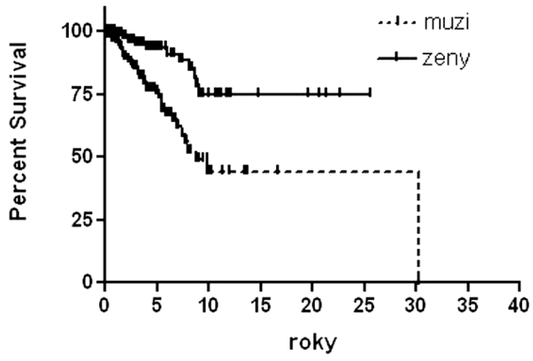
Analýza pravděpodobnosti přežití

Při mediánu sledování 3,7 roku bylo zaznamenáno 48 úmrtí (19,4 %). Pravděpodobnost doby přežití – overall survival (OS) celého souboru byla v 5 letech 83,5 % (CI 95 %, 78,0–89,0 %) a v 10 letech 58,2 (CI 95 %, 47,0–69,4 %). Při srovnání OS pro jednotlivé proměnné je nadále udávána hodnota v 5 i v 10 letech.

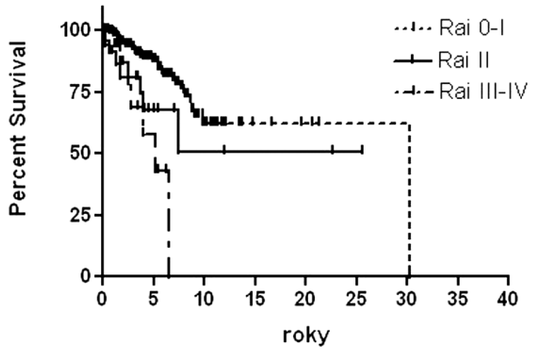
Srovnání pravděpodobnosti OS pro jednotlivé proměnné ukazuje tabulka 3.

Při srovnání OS podle pohlaví se ukázalo, že ženy mají signifikantně delší přežívání v 5 letech 93,5 % (CI 95 %, 87,8–99,2 %) proti 75,8 % (CI 95%, 87,0–84,6 %) u mužů, v 10 letech byl poměr 74,9 % proti 43,9 (p = 0,0002) (graf 1).

Klinické stadium podle Raie se ukázalo z hlediska prognostické výpovědi jako významné. Z důvodu menšího počtu nemocných v pokročilejších stadiích jsme sloučili nemocné ve stadiích 0–I a III–IV. Získané 3 skupiny pak zhruba odpovídají Binetovu rozložení do 3 skupin. Pravděpodobnost pětiletého OS v jednotlivých skupinách byla 88,1 % proti 67,9 % proti 57,6 % (p = 0,0002) – (graf 2).



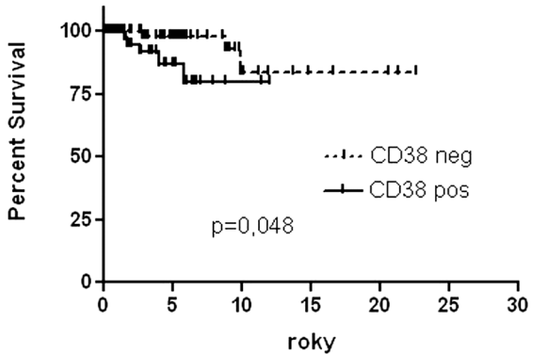
Graf 1. Rozdíl přežívání – muži x ženy.



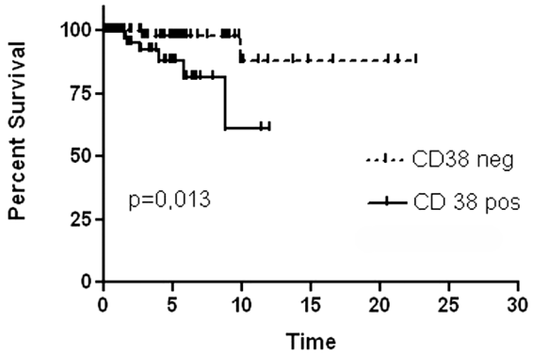
Graf 2. Srovnání OS: Klinická stadia dle Raie.

Při hodnocení významu imunofenotypizačních znaků bylo statistické hodnocení problematičtější vzhledem k menšímu počtu událostí ve vyšetřovaných skupinách (viz níže). Nicméně jsme byli schopni prokázat význam exprese CD38 i ZAP-70. Při použití hranice pozitivity 30 % buněk byla pravděpodobnost pětiletého přežití 98,0 % u CD38 negativních proti 87,0 % v případě CD 38 pozitivních (p = 0,05). Při použití hranice 20 % byl rozdíl v pěti letech prakticky identický, docházelo však k většímu rozevření křivek (p = 0,02) (grafy 3 a 4).

pfiedloha 1/11/07 3:06 PM Str. 236
proLékaře.cz | 31.10.2026



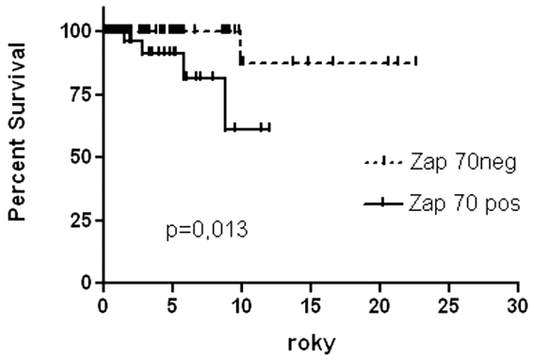
Graf 3. Srovnání OS: Exprese CD38 – cut off 30 % (p = 0,05).



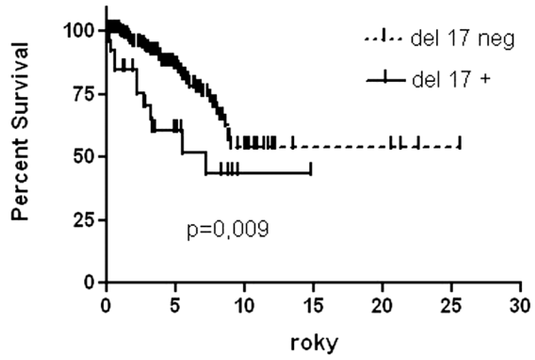
Graf 4. Srovnání OS: Exprese CD38 – cut off 20 % (p = 0,02).

ZAP-70 se ukázal jako statisticky významný prediktor vyšší pravděpodobnosti přežití v 5 resp. v 10 letech u nemocných ZAP-70 negativních s hodnotami 100,0 % versus 91,0 % a 87,5 % oproti 61,1 % respektive (p = 0,05) (graf 5).

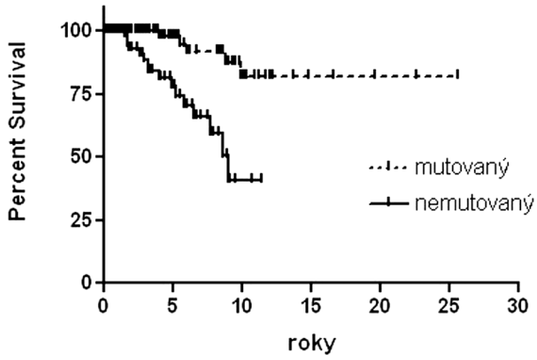
Při hodnocení vlivu nálezů chromozomálních aberací se ukázalo, že pouze u 79 nemocných byly vyšetřeny všechny čtyři sledované aberace. Vzhledem k možné vzájemné vazbě jednotlivých změn a relativně malému počtu událostí v této skupině jsme rozhodli hodnotit každou změnu zvlášť i za cenu jisté nepřesnosti. Nálezy, které ležely přesně na hladině cut-off, byly brány jako negativní. Nenalezli jsme signifikantní rozdíl mezi skupinami, které měly chromozomovou změnu del(11)(q22.3) proti negativní a del(13)(q14) proti negativní. Trend ve smyslu horší prognózy byl zaznamenán



Graf 5. Srovnání OS: Exprese ZAP-70 (p = 0,02).



Graf 6. Srovnání OS: Přítomnost del(17)(p13) (p = 0,009).



Graf 7. Srovnání OS: Mutační stav IgV_H (p = 0,0001).

ve skupině postižené trizomií 12 proti skupině s negativním nálezem s pravděpodobností pětiletého přežití 74,9 % oproti 83,2 % (ns, p = 0,09). Signifikantně horší prognózu ve smyslu horšího pětiletého přežití měli nemocní s del(17)(p13) 60,6 % proti 85,9 % u nemocných bez tohoto nálezu (p = 0,009) (graf 6).

Při hodnocení významu mutačního stavu IgV_H jsme prokázali, že nemocní s nemutovanou variantou CLL měli signifikantně kratší přežití, když medián přežití byl 8,9 roku a ve skupině s mutovaným stavem nebyl dosažen. Pravděpodobnost OS v 5 letech byla ve skupině s mutovanou formou genu IgV_H 97,9 % proti 77,9 % a v 10 letech 82,3 % proti 40,7 % ve skupině s nemutovanou variantou (p = 0,0001) (graf 7).

Vzhledem k tomu, že vyšetřování jednotlivých proměnných nebylo prováděno vždy při diagnóze, byla možná selekce testována srovnáním OS pro všechny vyšetřené proti nevyšetřeným (tab. 4). Ukázalo se, že existují signifikantní rozdíly v pravděpodobnosti přežití ve prospěch vyšetřované skupiny u mutačního stavu

Tab. 3. Srovnání rozdílu v pravděpodobnosti OS mezi nemocnými vyšetřenými pro jednotlivé parametry a nevyšetřenými.

mutační stav IgV_H	0,002
exprese CD38	0,0001
exprese ZAP-70	0,0001
del(11)(q22.3)	ns
+12	ns (0,07)
del(13)(q14)	0,03
del(17)(p13)	0,05

pfiedloha 1/11/07 3:06 PM Str. 237
proLékaře.cz | 31.10.2026

IgV_H (p = 0,002), exprese CD38 (p = 0,0001) a ZAP-70 (p = 0,0001). U imunofenotypizačních vyšetření to bylo dáno signifikantně nižším počtem událostí ve skupinách vyšetřovaných (8 resp. 5) proti skupinám nevyšetřovaným (40 resp. 43) (p = 0,00001). Ve skupině cytogenetické nebyl zaznamenán rozdíl při vyšetřování del(11)(q22.3), naopak rozdíl ve prospěch nevyšetřované skupiny byl zaznamenán při vyšetřování del(13)(q14), del(17)(p13) a trend při vyšetřování trizomie 12.

Diskuse

Názory na léčbu pacientů s B-CLL se postupně mění. V mnoha případech je možno (a dnes doporučováno) sledovat přirozený vývoj choroby a vyčkávat („watch and wait" strategie). Část pacientů s indolentní chorobou je klasifikována jako „smoldering CLL" (doutnající CLL) a mnohdy u nich nedochází k progresi nemoci. Nově je nyní v literatuře popisována B-monoklonální lymfocytóza nejasného významu – analogicky monoklonální gamapatii nejasného významu a plazmocytomu – její výskyt autoři udávají 0,5–1,0 % u dospělých se stoupající prevalencí se stoupajícím věkem až na 5 % po 60. roce života (24, 25). Vzácně zřejmě mohou u některých pacientů být i případy spontánní remise (vlastní pozorování). Za indikaci k zahájení léčby je dnes považována pouze progrese nemoci (tab. 4). Předčasné nebo nesprávně indikované zahájení terapie možná může vést k porušení „homeostázy choroby" a selekci agresivnějších leukemických klonů. Výsledkem by mohla být rychlejší progrese nemoci než bez léčby (26).

Vzhledem k tomu, že dnes již známe a máme možnost vyšetřovat rizikové faktory, při jejichž zhodnocení lze s určitou pravděpodobností předpovědět vývoj nemoci, analyzovali jsme na dosud nejrozsáhlejším souboru nemocných popsaném v českém písemnictví význam některých z těchto faktorů s cílem umožnit v budoucnosti individualizovanou volbu léčebného postupu. Jde o retrospektivní analýzu se všemi jejími přednostmi i limitacemi. Jednou z limitací byla nedostupnost výsledků všech vyšetření u celého souboru pacientů, což znesnadňuje multivariantní analýzu. Příčinou je fakt, že mnohdy se jedná o faktory poměrně nové, např. vyšetřování exprese ZAP-70 bylo zavedeno na základě prací z roku 2003 (14, 15) až v roce 2004, u dalších parametrů se jedná o období jen o několik let delší. CLL je přitom onemocnění s dlouhým průběhem a tak může docházet k selekčnímu bias, kdy nemocní s prognosticky nepříznivým onemocněním zemřeli před zavedením metody, zatímco nemocní s prognosticky příznivými znaky přežívají a mohou býti analyzováni, byť třeba byli diagnostikováni ve stejné době. Při nedostupnosti zamražených vzorků, tak může docházet k jistému zkreslení výsledků a to sice ve směru převahy pacientů s dobrými charakteristikami. Dlužno však podotknout, že se stejnými problémy se potýkají i další studie, v jejichž rámci byli vyšetřováni nemocní v různé fázi onemocnění a na základě jejichž výsledků byly prognostické skupiny definovány (10–12). Nadto je známo kolísání některých parametrů v průběhu choroby, jak je tomu například u exprese CD38 (11), nebo klonální vývoj chromozomálních aberací (27). I s těmito limity považujeme naše nálezy za významné a vypovídající o současné možnosti vyšetřování a významu biologických prognostických faktorů. Zaměřili jsme se v této práci proto na celkové přežití (s celkovým počtem 48 úmrtí = událostí) a multivariační analýzy se vzdali.

Tab. 4. Indikace k zahájení léčby u B–CLL.

Dřeňová insuficience (anémie, trombocytopenie)
Masivní (>10 cm) nebo progredující adenomegalie
Masivní (>6 cm) nebo progredující splenomegalie
Progresivní lymfocytóza
50% nárůst v průběhu 2 měsíců
lymphocyte doubling time (LDT) < 6 měsíců
Celkové příznaky
úbytek hmotnosti > 10 % za 6 měsíců
teploty
výrazná únava
noční poty
Autoimunní cytopenie

Není překvapivé zjištění, že ženy s CLL žijí déle než muži, v naší sestavě byl rozdíl vysoce signifikantní (graf 1). Otázka, proč tomu tak je, není jednoznačně zodpovězena a vysvětlení nepřinesla ani analýza řady biologických parametrů včetně molekulárně biologických (28). V naší sestavě bylo mezi muži více případů CLL bez přítomnosti mutace IgV_H (p = 0,03) a při analýze pouze „nemutovaných" případů byl zaznamenán statisticky nevýznamný trend k horší prognóze u mužů než u žen (p = 0,09). Zajímavé je, že tento fakt horší prognózy u mužů se obráží i v indikaci k alogenní transplantaci dřeně v retrospektivní analýze z ČR, kdy z 24 indikovaných nemocných bylo 22 mužů (29).

Mutační stav genu pro IgV_H se ukázal jako významný nezávislý prognostický faktor (10, 12). V naší sestavě bylo vyšetřeno a analyzováno 160 nemocných, z nichž byla nepříznivá nemutovaná sekvence nalezena u 44 %. Přes fakt, že ve skupině nevyšetřených nemocných byl vyšší počet úmrtí (27 z 88 proti 21 ze 160), i s relativně krátkým mediánem sledování byla přítomnost nemutované sekvence IgV_H shledána jako signifikantně zhoršující prognózu nemocných s mediánem přežití 9 let. V této souvislosti je důležité zdůraznit, že tento rozdíl přetrvával i při analýze časných klinických stadií dle Rai, odpovídající většinou Binetově stadiu A.

Analýza našeho souboru prokázala trvající platnost klasické kategorizace do tří prognostických skupin – klinická stadia dle Raie 0–I, II a III–IV (4) se ukázala jako fungující prognostický model.

Při analýze exprese CD znaků jsme narazili na problém relativně malého počtu událostí v analyzovaných

pfiedloha 1/11/07 3:06 PM Str. 238
proLékaře.cz | 31.10.2026

podskupinách, na čemž se pravděpodobně podílel faktor popsaný výše. Ve skupině 137 pacientů, u kterých byla vyšetřena exprese CD38, to bylo 8 úmrtí (proti 40 u 111 nevyšetřených) a ve skupině 109 pacientů s vyšetřením exprese ZAP-70 to bylo 5 úmrtí (proti 43 u 139 nevyšetřených). Přes tuto skutečnost byly rozdíly v pravděpodobnosti celkového přežití signifikantní. Pro ZAP-70 se oproti CD38 znaku zdá být skutečností větší stabilita v průběhu onemocnění (11).

Interpretace a statistická analýza nálezů chromozomálních aberací byla obtížná z důvodů zmíněných výše. Kompletní vyšetření bylo dostupné jen u 79 nemocných, proto byli nemocní analyzováni podle přítomnosti či nepřítomnosti jednotlivých chromozomálních aberací. Incidence jednotlivých abnormalit byla obdobná jako v již dříve publikované práci zahrnující pacienty i z jiných center (20, 21, 30) a odpovídala i incidenci publikované v práci Döhnerově (27).

Prognostický význam pro přežití byl demonstrován u delece17p, kdy přítomnost této delece znamenala signifikantně horší prognózu pro přežití (p= 0,009). Trend jsme zaznamenali u trisomie 12 chromozomu.

Nebyli jsme schopni demonstrovat vliv delecí v oblasti ATM genu (případně del(11)(q22.3)) na přežití při 13 pozitivních a 66 normálních nálezech. Jedním z možných vysvětlení je právě skutečnost malého množství vyšetřených nemocných, při hodnocení počtu úmrtí v jednotlivých skupinách to bylo 12 % ve skupině bez delece a 23 % ve skupině s delecí.

Při analýze významu del(13)(q14) byla pravděpodobnost OS stejná ve skupině s delecí i bez ní. Při subanalýze skupin s touto delecí jako jedinou abnormalitou a skupiny bez jakékoli abnormality (normální nález) byl osud obou skupin stejný.

Jaký mohou mít biologické prognostické faktory význam pro volbu iniciální terapie, je stále předmětem diskuse. Jednou z důležitých otázek je standardizace těchto metod a ověření jejich významu v prospektivních klinických studiích.

Naše názory na problematiku léčby jsou shrnuty na jiném místě v tomto čísle, stručně však lze říci, že v běžné klinické praxi se rozhodnutí o zahájení terapie stále odvíjí od klinického stavu nemoci – léčbu zahajujeme při pokročilém nebo progredujícím onemocnění a základním léčebným přístupem jsou režimy založené na fludarabinu a v budoucnu jistě v kombinaci s monoklonálními protilátkami. Zda opravňuje přítomnost těchto faktorů zahájení léčby v iniciálních stadiích, je předmětem klinických studií, stejně jako použití intenzivní léčby s vysokodávkovanou terapií (31) v časnějších fázích léčby. Vzhledem k prakticky stoprocentním relapsům po autologní transplantaci kmenových buněk (ASCT) resp. objevujícímu se plateau v křivkách přežití, které signalizují, že ASCT může pouze prodloužit *přežívání bez známek nemoci* (disease-free surrvival) se v posledních letech zvažuje použití alogenní transplantace jako možné terapie u vybraných nemocných (mladší s rizikovými faktory předpokladem agresivního průběhu nemoci (32, 33), zatím ve stadiu klinických studií.

Závěr

Cílem této studie bylo zhodnocení možností přesnějšího určení prognózy a rizikových faktorů v době diagnózy B-chronické lymfocytární leukemie při použití moderních diagnostických metod. Přesné určení prognózy má vliv na rozhodování, kdy je pro pacienta nejlépe léčbu začít, ale i na rozhodnutí jakým způsobem daného pacienta léčit. Většina v současné době rutinně používaných možností terapie sice vede ke zmírnění symptomů případně k laboratornímu zlepšení, nikoliv však k prodloužení celkové doby přežití či k vyléčení (Kalil, 2000). Zhodnocení efektu nových léků a postupů léčby (monoklonální protilátky, transplantace krvetvorných buněk, inhibitory cyklin-dependentních kináz) na celkovou dobu přežití pacientů vzhledem k relativně příznivě dlouhému průměrnému přežívání pacientů s B-chronickou lymfocytární leukemií ještě není možné.

Literatura

1. **Chin YI, Browman G, Wong S, Esmail R, Meyer R, et al.** The role of fludarabine in intermediate- and high risk chronic lymphocytic leukaemia. Cur Oncol 1998; 6: 90–102.
2. **Kalil N, Cheson BD.** Management of chronic lymphocytic leukaemia. Drugs Aging 2000; 16: 9–27.
3. **Bosch F.** Chronic lymphocytic leukemia: Diagnosis, prognosis and treatment, LyFE meeting, Barcelona 2005.
4. **Rai KR, Sawitzky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS.** Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1975; 46: 219–234.
5. **Binet JL, Leporrier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, et al.** A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia, Prognostic significance. Cancer 1977; 40: 855–864.
6. **Hallek M, Langenmayer I, Nerl Ch, Knauf W, Dietzfelbinger H, et al.** Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 93(5): 1732–1737.
7. **Juliusson G, Oscier D, Gahrton G. for the International Working Party on Chromosomes in CLL (IWCLL):** Cytogenetic findings and survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Second IWCLL compilation of data on 662 patients. Leuk Lymphoma 1991; 5: 21–25.
8. **Michalová K, Zemanová Z, Cmunt E, Karban J, Březinová J, et al.** Význam interfázické fluorescenční in situ hybridizace (I-FISH) pro vyšetření nemocných s chronickou lymfatickou leukémií. Čas Lék čes 2000; 139: 334–338.
9. **Jarošová M, Jedličková K, Holzerová M, Urbanová R, Papajík T, et al.** Přínos metod molekulární cytogenetiky pro určení prognosticky významných chromozomových změn u nemocných s chronickou lymfatickou leukemií. Čas Lék čes 2000; 18: 564–569.
10. **Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK.** Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94: 1848–1854.
11. **Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, et al.** CD38 expression and immunoglobulin variable region mutation are independent prognostic variables in chronic lymp-

pfiedloha 1/11/07 3:06 PM Str. 239
proLékaře.cz | 31.10.2026

hocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. Blood 2002; 99: 1023–1029.
12. **Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, et al.** IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94: 1840–1847.
13. **Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al.** Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and VH gene mutation status in pathogenesis and clinical course. Leukemia 2002; 16: 993–1007.
14. **Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, et al.** ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome and distinct gene expression profile. Blood 2003; 101: 4944–4951.
15. **Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al.** ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2003; 348: 1764–1775.
16. **Nückel H, Rebmann V, Dürig J, Dührsen U, Grosse-Wilde H.** HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodefficiency in chronic lymphocytic leukemia, Blood 2005; 105: 1694–1698.
17. **Schulz H, Winkler U, Staak JO, Engert A.** The monoclonal antibodies CAMPATH-1H and Rituximab in the therapy of chronic lymphocytic leukemia. Onkologie 2000; 23: 526–532.
18. Chronic lymphocytic leukemia - still an incurable disease. Drug Ther Perspect 2000; 16(10): 4–9.
19. **Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, et al.** National Cancer Institute – sposored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. Blood 1996; 87: 4990–4997.
20. **Cmunt E, Michalová K, Zemanová Z, Karban J, Šindelářová L, et al.** Význam risikových faktorů u pacientů s B-CLL v době diagnosy. Sborník Lékařský, 2002; 103(3): 359–370.
21. **Cmunt E, Michalová K, Zemanová Z, Karban J, Šindelářová L, et al.** Použití imunofenotypisace lymfocytů a cytogenetiky při zpřesnění prognosy u pacientů s B-CLL. Čas Lék Čes 2003; 142(2): 106–111.
22. **Peková S, Marková J, Pajer P, et al.** Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgVH rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. Molec Diagn 2005; 9: 23–34.
23. **Kaplan E, Maier P.** Nonparametric estimation from incomplete observation, J Am Stat Assoc 1958; 53: 457.
24. **Marti GE, Rawstron AC, Ohia P, Hillmen P, Houlston RS, et al.** Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. Br J Haematol 2005; 130: 325–332.
25. **Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Culen M, Kennedy B, et al.** Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. Blood 2002; 100: 2289–2291.
26. **Hallek M.** The role of minimal residual disease elimination in the outcome of chronic lymphocytic leukemia. Haematologica Reports 2005; 1(2): 30–32.
27. **Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, et al.** Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia, N Engl J Med 2000; 343: 1910–1916.
28. **Hamblin TJ, Orchard JA, Davies ZA, et al.** In chronic lymphocytic leukemia females survive for longer time than males even in patients with unmutated immunoglobulin genes, ASH Annual Meeting Abstracts 2004; 104: 16.
29. **Trněný M, Válková V, Kozák T, et al.** Retrospektivní analysa výsledků nemocných transplantovaných pro chronickou lymfatickou leukemii – data z Národního registru pro transplantace krvetvorných buněk. Transf a Hemat dnes 2006, v tisku.
30. **Sindelarova L, Michalova K, Zemanova Z, Cmunt E, et al.** Incidence of chromosomal anomalies detected with FISH and their clinical correlations in B-chronic lymphocytic leukemia Cancer Genet Cytogenet 2005: Jul 1, 160 (1): 27–34.
31. **Trneny M, Salkova J, Karban J, et al.** Combined therapeutic modality with Rituximab, Fludarabin and cyclophosphamide followed by high dose therapy with autologous stem cell transplantation (ASCT) leads to excellent response rate and high probability od molecular remission in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients, (abstract). Blood 2002; 100: 804a.
32. **Dreger P**, **Corradini P, Kimby E, et al.** Consensus on indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: a proposal of the EBMT CLL subcommittee. Leuk Lymphoma 2005; 46: 114.
33. **Paneesha S, Milligan DW.** Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia, Br J Haematol 2004; 128: 145–152.
34. **Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, et al.** 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterised by extensive nodal involvement and inferior prognosis. Blood 1997; 89: 2516–2522.

MUDr. Eduard Cmunt, CSc.
I. interní klinika VFN
U nemocnice 2
128 08 Praha 2
e-mail: cmunt@vfn.cz

Úprava do tzv. progresivní češtiny byla provedena v redakci časopisu s pasivním souhlasem prvního autora.

Došlo do redakce: 28. 4. 2006
Přijato: 21. 8. 2006