

Klonální evoluce u chronické lymfocytární leukemie

Brejcha M.¹, Mayer J.², Klodová D.¹, Sobotka J.¹, Wróbel M.¹, Doubek M.², Brychtová Y.², Pospíšilová Š.²

¹Hematologické oddělení, Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín*

²Interní hematooonkologická klinika FN Brno*

*Kooperující pracoviště České leukemické skupiny – pro život (CELL, The Czech Leukemia Study Group – for Life)

Souhrn

Významným prognostickým faktorem u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií je nález chromozomálních aberací. Jejich průkaz pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace umožňuje rozdělit pacienty do prognostických skupin s rozdílným celkovým přežitím a intervalem od diagnózy do zahájení první terapie. Nález delece 17p je spojený s rezistencí na standardní chemoterapeutické režimy a průkaz této aberace může modifikovat léčebné rozhodnutí. Protože změny karyotypu nejsou stabilní po celou dobu onemocnění a v průběhu choroby může dojít ke klonální evoluci se vznikem nových aberací, je vhodné provádět cytogenetické vyšetření nejen při diagnóze, ale zvláště před zahájením každé linie léčby.

Klíčová slova: chronická lymfocytární leukemie, chromozomální aberace, klonální evoluce

Summary

Brejcha M., Mayer J., Klodová D., Sobotka J., Wróbel M., Doubek M., Brychtová Y., Pospíšilová Š.: Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia

Chromosomal aberrations have important prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia. Aberrations detected by fluorescence *in situ* hybridization define specific subgroups that differ in the overall survival and the time from diagnosis to first treatment. Patients with deletion 17p appear resistant to standard chemotherapy regimens and detection of this cytogenetic abnormality may influence therapeutic decisions. Because additional genetic defects (clonal evolution) may be acquired during the course of the disease, cytogenetic analysis is recommended not only at diagnosis, but prior every line of the treatment.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, chromosomal aberrations, clonal evolution

Transfuze Hematol. dnes, 15, 2009, No. 2, p. 103–106.

Úvod

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější leukemií v dospělém věku v Evropě a Severní Americe. Klinický průběh onemocnění je velmi různorodý. U některých pacientů může mít onemocnění dlouhé, roky trvající bezpříznakové období s jediným znakem nemoci – lymfocytózou. Na druhé straně jsou pacienti, u kterých má nemoc agresivní průběh i přes řádně vedenou terapii. Základní prognostický údaj v době diagnózy poskytuje stanovení klinického stadia dle Raie a Bineta (1, 2). Tyto stážovací systémy definují nízké (Rai 0, Binet A), střední (Rai I/II, Binet B) a vysoké (Rai III/IV, Binet C) riziko onemocnění. Mezi jednotlivými rizikovými skupinami kolísá medián přežití od 1–3 let u pacientů ve vyšším klinickém stadiu až po více než 10 let u pacientů v stadiu nízkém. Mezi pacienty stejného klinického stadia je přesto značná variabilita v chování nemoci. Individuální riziko progresu lze definovat na základě řady klinických a laboratorních nálezů, včetně moderních cytogenetických a molekulárně genetických vyšetření (3, 4). Chromozomální aberace jsou u chronické lymfocytární leukemie v současnosti detekovány především fluorescenční *in situ* hybridizací (5, 6). Po zavedení nové metody kultivace buněk (CPG oligonukleotidy s interleukinem 2) se zvýšil záchyt aberací klasice-

kým vyšetřením karyotypu a byl dále rozšířen prognostický význam cytogenetického vyšetření (7–9). Kromě toho, že cytogenetické abnormality mají významnou prognostickou hodnotu, je jejich nález důležitý pro stanovení léčebné strategie (10). Pacienti s chronickou lymfocytární leukemií mohou v průběhu onemocnění podstoupit i více linií terapie. Při volbě léčebného protokolu je nutno vzít v úvahu, že změny karyotypu nemusí být stabilní po celou dobu trvání nemoci.

Cytogenetické vyšetření

Při klasickém cytogenetickém vyšetření jsou u pacientů s CLL prokazovány chromozomální aberace ve 40 až 50 % případů (11). Se zavedením metodiky fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se záchyt cytogenetických změn u CLL zvýšil na více než 80 %, přičemž nejčastěji prokazovanými aberacemi jsou delece 13q, delece 11q, trisomie 12 a delece 17p (5). Jednotlivé aberace korelují s celkovým přežitím (OS – overall survival) a intervalem do nutnosti zahájení léčby (TFS – treatment free survival) (5, 6). Nálezy delece 17p a delece 11q jsou považovány za prognosticky nepříznivé, zatímco ostatní nálezy jsou prognosticky příznivé (delece 13q), nebo neutrální (normální karyotyp, trisomie 12). Na základě porovnání jednotlivých aberací s klinickým průběhem nemoci bylo definováno celkem 5 prognostických skupin

a vytvořen tzv. hierarchický model chromozomálních abnormalit (viz tab. 1). Kromě prognostického významu chromozomálních aberací byla prokázána jejich souvislost s klinickým chováním nemoci. Pro delecí 11q je charakteristická lymfadenopatie, pro delecí 17p rezistence na standardní chemoterapeutické režimy obsahující alkylační cytostatika a purinová analoga (12, 13). Novou prognostickou podskupinu u CLL představuje nález chromozomálních translokací. Po zavedení nové metodiky stimulace (CPG oligonukleotidy s interleukinem 2) se zvýšil záchyt chromozomálních aberací při klasickém cytogenetickým vyšetřením na přibližně 80 % a zároveň bylo prokázáno, že pro CLL jsou charakteristické především nebalancované translokace (7, 8). Na souboru 96 pacientů bylo následně zjištěno, že nález translokací koreluje se zkrácením OS (94 vs. 346 měsíců) i TFS (24 vs. 106 měsíců) (9). V této studii bylo zároveň prokázáno, že nález translokací modifikuje prognózu pacientů definovanou dle FISH. U pacientů s izolovanou delecí 13q byl nález translokací spojen se signifikantně kratším TFS (41 vs. 132 měsíců), u nemocných s delecí 11q zkrátil nález translokací TFS ze 48 měsíců na 13 měsíců.

Tab. 1. Hierarchický model chromozomálních abnormalit u CLL dle Döhnera a kol. (2000).

Cytogenetická změna	Výskyt (%)	Medián přežití (měsíce)	TFS (měsíce)
17p-	7	32	9
11q- bez 17p-	17	79	13
+ 12 bez 17p- a 11q-	14	114	33
normální karyotyp	18	111	49
13q- bez 17p-, 11q- a +12	36	133	92

Klonální evoluce

Současně s průkazem cytogenetických abnormalit u CLL vyvstala otázka, zda jsou tyto aberace charakteristické pro maligní klon, či zda se v průběhu choroby mohou objevit další změny, které pak mohou eventuálně ovlivnit prognózu nemocných. Práce, které byly publikovány koncem 80. a počátkem 90. let minulého století, prokázaly, že ke klonální evoluci sice dochází, není ale příliš častá a nemá významnější dopad na prognózu. Největší práce z té doby pochází od Osciera a kol., kteří sledovali 112 pacientů s CLL (14). Změna karyotypu byla zaznamenána u 16 % (18/112) nemocných, pouze u jednoho z nich však byla jasná korelace mezi progresí choroby, změnou morfologie a změnou karyotypu. U ostatních pacientů s novou cytogenetickou změnou sice choroba progredovala, ale k progresi došlo ještě před vznikem nové změny karyotypu. Podobné výsledky měly i další dvě práce, které sledovaly menší počty pacientů. Juliusson a kol. zjistili změnu karyotypu u 15 % (6/41) sledovaných jedinců, přičemž pouze u dvou z nich se projeví současně i klinické změny (15). Nowel a kol. sledovali 21 pacientů po dobu 2 a více let (16). U 62 % (13/21) došlo k progresi choroby s nutností léčby, ani v jednom případě nebyla zaznamenána nová cytogenetická změna. Avšak mezi dalšími 12 pacienty, sledovanými

méně než 2 roky, se vyskytli 4, kteří měli klonální evoluci, jež byla spojená s časnou mortalitou.

Z druhé poloviny 90. let minulého století pochází dvě práce, které přinesly poněkud odlišný pohled na změny karyotypu v průběhu CLL. Klonální evoluci považovaly za častější a zvláště prognosticky významný nález. Fegan a kol. prospektivně sledovali 45 pacientů s CLL (17). Klonální evoluce byla zjištěna v průběhu pětiletého sledování u 38 % (17/45) z nich a signifikantně korelovala s progresí choroby. Z celkového souboru došlo k progresi choroby u 35 % (16/45) pacientů a v této skupině byly změny karyotypu signifikantně častější (12/16, 75 %) než u jedinců se stabilní chorobou (5/29, 17 %). Podobné výsledky zaznamenali i Finn a kol. (18). Při sledování 51 pacientů došlo ke změně karyotypu u 43 % nemocných (22/51) a klinicky definovaná progres (zvýšení Rai stadia či úmrtí na CLL) byla častější u jedinců se změnou karyotypu. Mezi nemocnými s klonální evolucí choroba progredovala u 50 % (11/22), zatímco mezi pacienty se stabilním karyotypem progredovala klinicky pouze u 17 % (5/29).

První práci sledující frekvenci klonální evoluce při použití FISH analýzy představili Shanafelt a kol. (19). V této prospektivní studii bylo sledováno 159 nemocných s dosud neléčenou CLL. Během pozorování byly změny cytogenetického nálezu zjištěny u 11 % (18/159) pacientů, přičemž míra klonální evoluce stoupala s trváním diagnózy. V prvních 2 letech sledování k ní došlo pouze u jednoho pacienta oproti 17 sledovaným 5 a více let. Medián vzniku nové cytogenetické změny od prvního FISH vyšetření byl 7,8 roků (od 1,9 do 11 roků). Celkem u 5 nemocných znamenala nová cytogenetická abnormalita zhoršení prognózy dle hierarchického modelu (viz tab. 2). Klonální evoluce byla častější mezi ZAP-70 pozitivními než ZAP-70 negativními jedinci. Podobný trend byl sledován i u nemocných s nemutovaným IgV_H genem, zde ale nebylo dosaženo statistické významnosti pro malý počet pacientů, u kterých byl znám IgV_H status. Klonální evoluce byla také častější u pacientů, kteří byli v průběhu sledování léčeni. Před vznikem změny karyotypu léčbu podstoupilo celkem 71 % nemocných. U všech pacientů s mutovaným IgV_H genem byla novou cytogenetickou abnormalitou delecí 13q, zatímco mezi jedinci s nemutovaným IgV_H genem se u 4 nově objevila delecí 17p a u jednoho delecí 11q. Ukazuje se tak, že pacienti ZAP-70 pozitivní nebo s nemutovaným IgV_H genem mají větší chromozomální instabilitu, a s tím spojené větší riziko vzniku nové cytogenetické změny. Vzhledem k tomu, že nově získané aberace u některých nemocných zhoršily

Tab. 2. Klonální evoluce se zhoršením rizika dle hierarchického modelu. Podle Shanafelta (2006).

Vstupní FISH vyšetření	FISH při průkazu klonální evoluce
+ 12	+ 12, 17p-
13q-	13q-, 11q-
normální karyotyp	17p-
normální karyotyp	13q-, 17p-

Tab. 3. Medián přežití od doby zjištěné klonální evoluce (medián sledování 2,1 roku). Podle Shanafelta (2008).

Typ klonální evoluce	Medián přežití (roky)
žádná klonální evoluce	medián nedosažen
jakákoliv klonální evoluce	2,3
nově 17p- nebo 11q-	1,3
jiná změna než 17p- nebo 11q-	medián nedosažen

prognózu dle hierarchického modelu, bylo možné předpokládat, že klonální evoluce představuje nepříznivý prognostický faktor. Toto bylo potvrzeno na stejném souboru o 2 roky později (20). Medián přežití mezi pacienty s klonální evolucí byl 2,3 roky, u jedinců bez klonální evoluce nebyl medián dosažen. Prognózu nemocných s klonální evolucí také ovlivnilo to, jaký typ aberace získali. Medián přežití pacientů, kteří získali delecí 17p nebo 11q, byl 1,3 roku, u jedinců s jinou novou aberací (nejčastěji delecí 13q) nebyl medián dosažen (viz tab. 3).

Opakované FISH vyšetření prováděli u pacientů s CLL také Stilgenbauer a kol. (21). Retrospektivně bylo zhodnoceno 64 pacientů s opakovaným cytogenetickým vyšetřením a u 17 % (11/64) z nich se v průběhu sledování objevila nová cytogenetická abnormalita: u čtyř delecí 17p, u tří delecí 6q, u dvou delecí 11q, u jednoho trisomie chromozomu 8, a u tří došlo k evoluci z monoalelické delecí 13q do bialelické delecí 13q. Ve skupině s klonální evolucí byla patrná progresse v klinickém stadiu dle Bineta (82 % vs. 28 %) a častěji bylo nutno zahájit léčbu u dosud neléčených nemocných (91 % vs. 62 %). Klonální vývoj byl zaznamenán pouze u jedinců s nemutovaným IgV_H genem a změny karyotypu byly častější u léčených nemocných. Léčeno bylo 9 z 11 (82 %) pacientů, u kterých došlo ke změně karyotypu. Delecí 17p se objevila u tří pacientů, kteří byli předtím léčeni, ale byla také nově zjištěna u jednoho pacienta bez předchozí terapie. Klonální evoluce celkově představovala nepříznivý prognostický faktor, odhadovaný medián přežití od detekce klonální evoluce byl 21,7 měsíců.

Profil genové exprese

Poměrně novou technologií v onkologické diagnostice je využití tzv. DNA čipů (DNA microarrays), které dokážou stanovit stupeň exprese několika tisíců genů současně v jedné reakci a pomocí specializovaného softwaru je následně vytvořen tzv. profil genové exprese (gene expression profile – GEP) analyzovaného vzorku. Využití DNA čipů v hematologické diagnostice je poměrně známé u difuzního velkobuněčného B lymfomu, kde pomocí stanovení profilu genové exprese lze odlišit 2 subtypy tohoto lymfomu s odlišnou prognózou (22). Chronická lymfocytární leukémie představuje další z hematologických malignit, na které byla problematika DNA čipů zkoumána. Rozdílným profilem genové exprese u pacientů se stabilní a progredující chorobou se zabývali např. Fält a kol. (23). Profil genové exprese byl stanoven u 11 pacientů se stabilní a 10 pacientů s progredující chorobou. Při porovnání GEP obou skupin byla nalezena skupina genů,

kteří by byli schopni odlišit obě klinické jednotky s přesností 70–90 %. Na problematiku změny genové exprese při progresi CLL se zaměřili Fernandez a kol. (24). U 16 pacientů s CLL byl opakovaně stanoven GEP. První vyšetření bylo provedeno v době diagnózy při nízkém klinickém stadiu (Binet A) a druhé vyšetření při progresi choroby (Binet B, C). Většina pacientů (15/16) měla nemutovaný IgV_H gen a byla ZAP-70 pozitivní (12/16). Pro srovnání byli opakovaně vyšetřeni i 3 pacienti se stabilní chorobou (všichni měli nemutovaný IgV_H gen a byli ZAP-70 pozitivní). Při stanovení GEP v době diagnózy a při progresi nemoci byla zjištěna skupina 58 genů odlišně exprimovaných v obou situacích. Toto nebylo pozorováno u pacientů s klinicky stabilní chorobou. Kromě GEP bylo vstupně provedeno i vyšetření komparativní genomovou hybridizací, která prokázala chromozomové změny u 56 % (9/16) pacientů. Při opakovaném vyšetření při progresi choroby byly u dalších 2 pacientů (2/16, 12,5 %) zjištěny nové chromozomální aberace. Progrese choroby tak byla spojena nejen se změnou GEP, ale i se změnou karyotypu.

Závěr

Přestože z uvedených skutečností vyplývá, že ke změně karyotypu dochází u necelých 20 % pacientů s CLL, klonální evoluce představuje nepříznivý prognostický faktor spojený se zkrácením celkového přežití. Očekávat ji lze spíše u nemocných s delším trváním nemoci, u pacientů s nemutovaným IgV_H genem, pozitivitou ZAP-70 a u těch, kteří již prodělali léčbu. Vzhledem k významu cytogenetického vyšetření pro zvolení léčebné strategie, by toto mělo být provedeno u všech pacientů, u nichž přichází v úvahu podání chemoterapie. Pro možný vznik klonální evoluce je vhodné vyšetření opakovat i před každou další linií léčby. V době diagnózy přináší cytogenetické vyšetření především prognostický údaj a jeho indikace by měla být rutinní.

Seznam použitých zkratk

CLL – chronická lymfocytární leukémie
FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace
GEP – profil genové exprese
TFS – doba bez nutnosti léčby
OS – celkové přežití

Literatura

1. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219–234.
2. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198–206.
3. Mayer J, Schwarz J, Doubek M, et al. Co nám v každodenní praxi skutečně říkají tzv. moderní prognostické faktory u chronické lymfatické leukémie? *Transf Hematol* 2007; 13: 106–116.
4. Papajik T, Jarošová M, Pikalová Z, Indrák K. B-chronická lymfatická leukémie. Část II: Diagnostická kritéria a význam stavení

- individuální prognózy nemocného. *Transfuze Hematol* 2006; 12: 132–139.
5. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910–1916.
 6. Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) station status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1410–1416.
 7. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgV_H status, and CD38 expression. *Blood* 2006; 108: 3152–3160.
 8. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. 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: 2442–2451.
 9. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 742–751.
 10. Hallek M., Cheson BD, Katovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446–5456.
 11. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990; 323: 720–724.
 12. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2516–2522.
 13. Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and nonresponse to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85: 1580–1589.
 14. Oscier D, Fitchett M, Hergert T, Lambert R. Karyotypic evolution in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1991; 3: 16–20.
 15. Juliusson G, Friberg K, Gahrton G. Consistency of chromosomal aberrations in chronic B-lymphocytic leukemia. *Cancer* 1988; 62: 500–506.
 16. Nowell PC, Moreau L, Growney P, Besa EC. Karyotypic stability in chronic B-cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 33: 155–160.
 17. Fegan C, Robinson H, Thompson P, Whittaker JA, White D. Karyotypic evolution in CLL: Identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 1995; 9: 2003–2008.
 18. Finn WG, Kay NE, Kroft SH, Church S, Peterson LC. Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: A sequential study of karyotypic instability in 51 patients. *Am J Hematol* 1998; 59: 223–229.
 19. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4634–4641.
 20. Shanafelt TD, Hanson C, Dewald GW, et al. Karyotype evolution on fluorescent in situ hybridization analysis is associated with short survival in patients with chronic lymphocytic leukemia and is related to CD49d expression. *J Clin Oncol* 2008; 26(14): e5–e6.
 21. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007; 92: 1242–1245.
 22. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–511.
 23. Fält S, Merup M, Gahrton G, Lambert B., Wennborg A. Identification of progression markers in B-CLL by gene expression profiling. *Exp Hematol* 2005; 33: 883–893.
 24. Fernandez V, Jares P, Salaverria I, et al. Gene expression profile and genomic changes in disease progression of early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 132–136.

MUDr. Martin Brejcha
Hematologické odd., OC JGM
Máchova 30
741 01 Nový Jičín
e-mail: martin.brejcha@onkologickecentrum.cz

Doručeno do redakce: 16. 10. 2008
Přijato: 19. 2. 2009