



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕУКЕМИЈА: УТИЦАЈ МИКРОСРЕДИНЕ НА ИСПОЉАВАЊЕ ПРОГНОСТИЧКИХ МАРКЕРА И АПОПТОЗУ МАЛИГНИХ ЛИМФОЦИТА

Кључне речи : хронична лимфоцитна леукемија, прогностички маркери, спонтана апоптоза, цитокини

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) представља малигну болест хематопоезног ткива која настаје пролиферацијом и акумулацијом клона, малих, наизглед зрелих, имунолошки некомпетентних лимфоцита у периферној крви, костној сржи, лимфним чворовима, слезини и другим органима и најчешћа је леукемија одраслих. Након постављања дијагнозе, пред лекаром се поставља важан задатак процене брзине напредовања болести, као и прогнозе од којих заједно зависи време и врста терапије којом ће пацијент бити лечен. Последњих година истраживања у ХЛЛ-у усмерила су се ка проналажењу валиднијих прогностичких маркера, који би, у корелацији са досадашњим маркерима прогнозе болести, клиничару дали смернице за даље праћење и лечење пацијента. Претходним истраживањима дефинисано је неколико имунофенотипских прогностичких маркера (ZAP-70, CD38, bcl-2) који су показали до сада најбољу корелацију са прогнозом болести. Веома је занимљив податак представља и чињеница да се експресија појединих маркера (CD38) разликује међу лимфоцитима узоркованим из различитих средина (периферна крв, костна срж, лимфни чвор). Тиме се намеће и питање да ли ова разлика може утицати на терапијски одговор и исход болести. Такође, нејасно је и који медијатори средина или ћелијске интеракције утичу на ове различитости у експресији прогностичких маркера малигну лимфоцитну леукемију.

Циљ истраживања

Утврдити постојање евентуалне разлике у експресији маркера важних за прогнозу болести (ZAP-70, CD38, CD49d, bcl-2 и mcl-1) и нивоа спонтане апоптозе између малигну Б-лимфоцита периферне крви и костне сржи болесника са хроничном лимфоцитном леукемијом, као и постојање евентуалне разлике у цитокинском „*milliae*-у“ (TNF α , IL-6, IL-4, IFN γ , IL-10, IL-21, IL-12, TNF β , VEGF, FGF) костне сржи и периферне крви оболелих од ХЛЛ-а.



Актуелност истраживања

Леукемије, а међу њима и ХЛЛ, деценијама привлаче пажњу истраживача у бројним областима, највише због чињенице, да још у раним стадијумима болести, долази до миграције малигну хелија и насељавања бројних ткива и органа. Тако се данас зна да малигни лимфоцити у ХЛЛ-у насељавају периферну крв, костну срж, лимфне чворове, слезину, али и друге органе и да се у њима, у садејству солубилних фактора и околних хелија, одвија контрола пролиферације и апоптозе малигну лимфоцита, као и миграције (1). Интензивнија пролиферација и миграција, као и инхибирана апоптоза, утичу на клинички стадијум болести и време за које ће се број лимфоцита дуплирати („lymphocyte doubling time” – LDT) што се годинама користи у клиничкој пракси као параметри који утичу на прогнозу и брзину напредовања болести. Како се показало да ови параметри нису довољно прецизни, истраживања су се фокусирала на проналажење других, свеобухватнијих и валиднијих параметара прогнозе болести. Тако су почели да се користе биохемијски маркери прогнозе (лактат дехидрогеназа, бета2микроглобулин, тимидин киназа, С-реактивни протеин), а након тога и поједине хромозомске аберације (11p-, 17p-). Последњих година преовладали су имунофенотипски маркери прогнозе болести (ZAP-70, CD38) као маркери мутационог статуса варијабилних региона тешких ланаца IgV_H, као и експресија антиапоптоличких протеина (протеини инхибитори апоптозе, сурвивин, bcl-2, mcl-1). До сада је показано да ZAP-70 најбоље корелира са мутационим статусом варијабилних региона тешких ланаца IgV_H, док CD38 корелира са потенцијалом за пролиферацију малигну лимфоцита и варира у зависности од средине из које су изоловани малигни лимфоцити (1,2). Маркери инхибиране апоптозе су се показали као корисни и валидни, али истовремено и врло скупи, јер имају значаја само у корелацији са другим прогностичким маркерима (3). Стога је проналажење идеалног прогностичког маркера и даље је циљ бројних истраживања. Иако су имунофенотипски прогностички маркери доказани као најефикаснији у прогнози тока болести, најновија истраживања усмерена су ка испитивању ових прогностичких маркера у зависности од микросредине из које су узорковани малигни лимфоцити. Једно истраживање, у коме је анализирана експресија прогностичких маркера ZAP-70 и CD38 у узорцима периферне крви и костне сржи, ретроспективно је утврдило да се експресија прогностичких маркера ZAP-70 и CD38 разликује у зависности од извора изолованих лимфоцита, при чему је показано да је експресија испитиваних молекула знатно већа на лимфоцитима који су изоловани из костне сржи, него из периферне крви (4). Међутим, у том истраживању, узорци периферне крви и костне сржи припадали су различитим особама. Следила су истраживања у којима је анализирана експресија прогностичких маркера у лимфним чворовима, али без упоређивања са експресијом у другим микросрединама, или са другим прогностичким маркерима (5). Показано је да хелијски садржај микросредине које насељавају малигни лимфоцити утиче на цитокински „milieu”, и да тако, има значајан утицај на пролиферацију и апоптозу малигну лимфоцита (6), али до сада, ову чињеницу, нико није повезивао са експресијом прогностичких маркера и маркера инхибиције апоптозе. Како се за утврђивање експресије имунофенотипских маркера рутински користи узорак периферне крви, ова истраживања покренула су питање одакле потиче разлика у експресији, који су њени узроци и који узорак је клиничару највалиднији када решава у коју прогнозу групу ће сврстати одређеног пацијента.



Предмет и опис истраживања:

задачи, методологија, очекивани резултати

А. Задачи

1. Одредити експресију прогностичких маркера (ZAP-70, CD38, bcl-2, mcl-1 и CD49d) на малигним Б-лимфоцитима периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ-а.
2. Одредити ниво спонтане *ex vivo* апоптозе малигнух Б-лимфоцита периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ-а.
3. Испитати профил секретованих цитокина (TNF α , IL-6, IL-4, IFN γ , IL-10, IL-21, IL-12, TNF β , VEGF, FGF) у серуму и супернатанту костне сржи оболелих од ХЛЛ-а.

Б. Методологија

Истраживање представља компаративну клиничко-експерименталну студију која ће се реализовати у Клиници за хематологију КЦ Крагујевац и на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу. У студију ће бити укључено 34 *de novo* болесника оболелих од ХЛЛ-а. Овим истраживањем биће упоређивани испитивани параметри периферне крви и костне сржи код истог болесника. Свим испитаницима у студији биће узимани узорци периферне крви венепункцијом, у хепаринизоване вакутајнере (Веносафе, Терумо) у количини од 20ml у једном акту, пре доручка, као и узорак костне сржи (2ml) у локалној анестезији, по принципима асепсе и антисепсе. После центрифугирања (2000 обртаја/min, у трајању од 10 минута, на собној температури), издвојена плазма и супернатант костне сржи ће се разливати у аликвоте и чувати на -80°C до тренутка одређивања концентрација релевантних цитокина.

Спонтана *ex vivo* апоптоза НЛЛ В-лимфоцита периферне крви и костне сржи испитаника биће одређивана, после изолације лимфоцита на густинском градијенту, помоћу проточног цитометра, применом двоструког бојења флуоресцентним бојама Анексин V и 7-аминоактиномицин Д.

Експресија прогностичких маркера ZAP-70, CD38, bcl-2, mcl-1 и CD49d на малигним Б-лимфоцитима периферне крви и костне сржи испитаника биће одређивана применом проточне цитометрије, стандардним протоколом за површинске и интрацелуларне маркере.

Концентрација цитокина у серуму и супернатанту костне сржи испитаника ће се одређивати методом проточне цитометрије употребом FlowCytomix Multiplex кита (Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex FlowCytomix Multiplex, eBioscience).

У доступној литератури нема студија директно упоредивог дизајна са предложеним истраживањем. Стога је величина узорка израчуната на основу података о броју малигнух Б-лимфоцита костне сржи и периферне крви који експримирају ZAP-70 код пацијената са хроничном лимфоцитном леукемијом (4). Студијски узорак је прорачунат узимајући алфа грешку од 0.05, снагу студије од 0.95 и Df=5, коришћењем χ^2 теста и статистичког програма G*Power3. На основу броја малигнух Б-лимфоцита костне сржи и периферне крви који експримирају ZAP-70 (костна срж: ZAP-70(+) узорци - 81 (91%), ZAP-70(-) узорци - 8 (9%); периферна крв: ZAP-70(+) узорци - 121 (69%), ZAP-70(-) узорци - 55 (31%) студијски узорак је прорачунат на укупан број од 34 испитаника. Овакав налаз се заснива на чињеници да је дизајном студије предвиђено поређење испитиваних параметара две микросредине (костне сржи и периферне крви) истог болесника. Студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (χ^2 тестом), са снагом студије $\geq 95\%$.



В. Очекивани резултати

Малигни Б-лимфоцити који потичу из костне сржи имају нижи степен спонтане *ex vivo* апоптозе него малигни Б-лимфоцити периферне крви. Експресија прогностичких маркера ZAP-70, CD38, bcl-2, mcl-1 и CD49d већа је на малигним лимфоцитима костне сржи него периферне крви болесника оболелих од ХЛЛ-а. Концентрација релевантних цитокина (TNF α , IL-6, IL-4 и IFN γ) је већа у супернатанту костне сржи него у плазми оболелих од ХЛЛ-а.

Г. Значај истраживања

По својој учесталости, ХЛЛ представља водећу малигну хематолошку болест одраслих. Под овим ентитетом налази се велика група пацијента хетерогене клиничке презентације, прогнозе и терапијског одговора. Проналажење валиднијих и свеобухватнијих прогностичких маркера, као и њихово боље разумевање, допринеће лакшем груписању ових пацијената у прогнозне групе, а самим тим и правилнији избор терапијског приступа.

Д. Временски оквир

Сходно величини студијског узорка и броју пацијената са хроничном лимфоцитном леукемијом који се на годишњем нивоу дијагностикују и лече у Клиници за хематологију КЦ Крагујевац, предвиђено је да ова студија траје 12 месеци.

Ђ. Литература

1. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Grell R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 405-418.
2. Pittner BT, Shanafelt TD, Kay NE, Jelinek DF. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia B cells are associated with activation marker expression and differential responses to interferon stimulation. *Leukemia* 2005; 19: 2264-2272.
3. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: Forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cell. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20(3): 399-413.
4. Sheridan R, Mounajjed T, Ehrmann DE, Hurtubiuse PE, Schragger JA. Comparisson of bone marrow and peripheral blood ZAP-70 status examined by flow citometric immunophenotyping in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry part B (Clinical cytometry)* 2006; 70B: 320-321.
5. Sargent RL, Craig FE, Swerdkow SH. Comparaison of bcl-2, CD38 and ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Int Clin Exp Patholog* 2009; 2(6): 574-582.
6. Deaglio S, Malavasi F. Chronic lymphocytic leukemia microenvironment: shifting the balance from apoptosis to proliferation. *Hematologica* 2009; 94 (6): 752-756.