

DARIUSZ WOŁOWIEC

## **Czynniki rokownicze i predykcyjne w przewlekłej białaczce limfocytowej**

### **Prognostic and predictive factors in chronic lymphocytic leukemia**

Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Akademii Medycznej we Wrocławiu

Kierownik: Prof. dr hab. Kazimierz Kuliczkowski

---

#### **STRESZCZENIE**

Poszukiwanie czynników rokowniczych w przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL) ma na celu doskonalenie kryteriów rozpoczęcia leczenia cytostaticznego oraz jego strategii. W szczególności prowadzone są badania służące wyodrębnieniu pacjentów, którzy odnieśliby korzyść z wczesnego rozpoczęcia leczenia pomimo nie spełnienia obecnie obowiązujących kryteriów jego rozpoczęcia, jak również tych, u których byłaby celowa intensyfikacja terapii. Obok stadium zaawansowania klinicznego choroby określanego według systemu Rai'a lub Bineta, do najistotniejszych czynników rokowniczych co do przeżycia całkowitego i wolnego od progresji należą niektóre aberracje genetyczne, szczególnie dotyczące regionów 17p i 11q, a także stan mutacyjny genu łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (IgV<sub>H</sub>) oraz związana z nim ekspresja antygenów CD38 i ZAP-70. Delecja 17p lub mutacje zlokalizowanego tam genu p53 jest ponadto związana z opornością na analogi puryn. Określenie stanu mutacyjnego IgV<sub>H</sub>, ekspresji CD38 i ZAP-70 jest szczególnie przydatne u chorych kwalifikowanych do intensywnych procedur leczniczych, szczególnie allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych. Problem wyodrębnienia innych czynników złego rokowania, które uzasadniłyby wcześniejsze rozpoczęcie leczenia cytostaticznego, niż to przewidują obecnie obowiązujące standardy postępowania, wymaga natomiast dalszych badań.

**SŁOWA KLUCZOWE:** Przewlekła białaczka limfocytowa – Czynniki rokownicze

#### **SUMMARY**

Studies on the prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia (CLL) are necessary for improvement of criteria for starting the cytostatic treatment and for ameliorating its strategy. In particular, it seems important to single out patients with indolent CLL who may benefit from early or intensive cytostatic treatment. Besides Rai or Binet staging system, some chromosomal aberrations, in particular concerning 17p and 11q, heavy chain immunoglobulin gene (IgV<sub>H</sub>) mutational status, as well as CD38 and ZAP-70 expression, are currently considered as the most important prognostic factors as to progression free- and overall survival. Moreover, deletion of 17p and mutations of p53 gene which is localized in this region predict resistance to purine analogs and alkylating agents. Determination of IgV<sub>H</sub> mutational status and of CD38 and ZAP-70 expression is particularly useful in young patients, candidates for intensive therapeutic procedures, such as allogenic hematopoietic cells transplantation. The issue of defining of unfavourable

prognostic factors which may justify the early beginning, i.e. before the meeting of the currently admitted criteria, of cytostatic treatment, needs further studies.

**KEY WORDS:** Chronic lymphocytic leukemia - Prognostic factors

## WSTĘP

Poszukiwanie czynników rokowniczych w chłoniakach przewlekłych, w tym w przewlekłej białaczce limfocytowej (chronic lymphocytic leukemia, CLL) ma na celu doskonalenie kryteriów rozpoczęcia leczenia cytostaticznego oraz wyboru schematu terapeutycznego, a przede wszystkim wyodrębnienie tych pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści z wczesnego rozpoczęcia chemioterapii. Oceniając wartość rokowniczą danego czynnika badamy jego wpływ na całkowity czas przeżycia i czas przeżycia wolnego od progresji rozumianej jako zmiana stadium zaawansowania klinicznego lub pojawienie się wskazań do rozpoczęcia leczenia. Wartość predykcyjna danego wskaźnika pozwala natomiast przewidzieć odpowiedź pacjenta na leczenie. Należy podkreślić, że w chwili obecnej jedynymi czynnikami, uwzględnianymi obowiązkowo w rutynowej praktyce klinicznej, przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych u chorych na CLL jest stadium zaawansowania choroby, czas podwojenia się liczby limfocytów krwi obwodowej oraz kariogram. W szczególności uznanym czynnikiem predykcyjnym pozwalającym przewidzieć odpowiedź na leczenie lekami alkilującymi i analogami puryn jest obecność aberracji ramienia krótkiego chromosomu 17.

## Czynniki rokownicze determinujące decyzje terapeutyczne

Stadium zaawansowania klinicznego choroby wg klasyfikacji Rai lub Bineta [1, 2] należy do najistotniejszych czynników rokowniczych co do długości całkowitego przeżycia pacjentów. Oba systemy opierają się na ocenie rozległości zmian węzłowych, obecności zajęcia śledziony, wątroby oraz wydolności krwiotwórczej szpiku kostnego. Związek stadium zaawansowania z całkowitym przeżyciem jest wyraźny, gdyż oczekiwana długość przeżycia pacjentów w stadiach wczesnych (A wg Bineta i 0 wg Rai) wynosi przeszło 10 lat, podczas gdy u chorych w stadiach zaawansowanych (C wg Bineta i III-IV wg Rai) jest ona krótsza niż 2 lata. Ocena stanu zaawansowania klinicznego wg jednego z tych systemów jest obowiązkowym elementem postępowania diagnostycznego przy rozpoznaniu i w czasie obserwacji chorego także z tego powodu, że stwierdzenie niedokrwistości i/lub małopłytkowości, a więc stadium C wg Bineta i/lub III-IV wg Rai, stanowi wskazanie do rozpoczęcia leczenia cytostaticznego, pod warunkiem jednak, że zaburzenia te wynikają z niewydolności krwiotwórczej szpiku, a nie z zespołu autoimmunohemolitycznego.

Stadium zaawansowania klinicznego nie uwzględnia bezwzględnej liczby limfocytów krwi obwodowej. Istotne znaczenie rokownicze ma szybkość jej podwojenia. Czas podwojenia dłuższy niż 12 miesięcy wiąże się bowiem z długim okresem wolnym od leczenia i długim całkowitym przeżyciem [3]. Według zaktualizowanych zaleceń National Cancer Institute (NCI) czas podwojenia się liczby limfocytów krótszy niż 6 miesięcy, lub ich zwiększenie się o 50% w ciągu 2 miesięcy, są wskazaniem do rozpoczę-

cia leczenia cytostatycznego [4]. Należy jednak odnotować badania wskazujące, że również bezwzględna liczba limfocytów krwi obwodowej ma znaczenie rokownicze w CLL, gdyż jej wartość poniżej 30 G/l u pacjentów we wczesnych stadiach zaawansowania jest związana z dłuższym przeżyciem tak wolnym od progresji, jak i całkowitym [5].

Do najistotniejszych czynników rokowniczych w CLL zalicza się obecnie aberracje chromosomowe. Zostały one szczegółowo omówione w niedawno opublikowanym przeglądzie piśmiennictwa na ten temat [6]. Z uwagi na niską aktywność podziałową limfocytów CLL są one trudne do wykrycia metodami cytogenetyki klasycznej, jednak technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) pozwala na ujawnienie ich u przeszło 80% pacjentów. Do najczęstszych aberracji należą: delecja długiego ramienia chromosomu 13, długiego ramienia chromosomu 11, krótkiego ramienia chromosomu 17 oraz trisomia chromosomu 12. Silnym niekorzystnym znaczeniem rokowniczym obarczone są zwłaszcza del(11)(q22-23), tris12 oraz del 17p13. Są one związane z dużą masą nowotworu, progresywnością choroby, atypową morfologią limfocytów i krótkim całkowitym przeżyciem pacjentów. Aberracje krótkiego ramienia chromosomu 17 lub mutacje zlokalizowanego tam genu p53 są także związane z opornością na leki alkilujące i analogi puryn, z możliwym wyjątkiem kladrybiny [7]. Z tego powodu przed rozpoczęciem leczenia schematem zawierającym analogi puryn zaleca się wykonanie badania FISH w kierunku tej aberracji. Niektóre zaburzenia cytogenetyczne wiążą się natomiast z korzystnym rokowaniem. W szczególności opisano związek pomiędzy nieprawidłowościami w zakresie regionu 13q a długim przeżyciem całkowitym i wolnym od leczenia.

Dalszy postęp w poznaniu zaburzeń genomu u chorych na CLL stał się możliwy dzięki technice mikromacierzy SNP (single nucleotide polymorphism, polimorfizm pojedynczego nukleotydu) o wysokiej gęstości. Pozwala ona na zwiększenie czułości badania zmian chromosomowych, gdyż wykrywa zmiany liczbowe (utrata lub naddatek) alleli i regiony utraty homozygotyzmu o charakterze submikroskopowym, nie wykrywalne technikami cytogenetyki klasycznej ani FISH. Za pomocą tej metody opracowano skalę złożoności submikroskopowych aberracji genetycznych i wykazano, że wysoki wskaźnik złożoności jest niezależnym czynnikiem złego rokowania co do czasu do rozpoczęcia leczenia pierwszej i kolejnych linii [8].

### **Inne czynniki o uznanym znaczeniu rokowniczym**

Wyżej omówiono czynniki rokownicze, które zgodnie z obecnie obowiązującymi standardami postępowania winny być uwzględnione przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych. Znany jest również szereg innych czynników o uznanej wartości rokowniczej, które nie są obowiązkowo wykorzystywane w rutynowej praktyce klinicznej ze względu na wysoki koszt, trudności w wystandaryzowaniu metody, bądź też z uwagi na to, że ich stwierdzenie nie ma bezpośredniego wpływu na decyzje terapeutyczne. Do nich należą w szczególności aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH), surowicze stężenie  $\beta$ 2-mikroglobuliny, kinazy tymidyłowej (thymidine kinase, TK) i roz-

puszczalnego antygeny CD23 (sCD23), a także stan zmutowania genów regionu zmiennego łańcucha ciężkiego immunoglobulin ( $IgV_H$ ) i ekspresja antygenów ZAP-70 i CD38.

Surowicza aktywność LDH oraz stężenie  $\beta$ 2-mikroglobuliny, TK i sCD23 należą do najwcześniej zidentyfikowanych czynników rokowniczych w CLL. Oba te wskaźniki są powszechnie używane w ocenie masy nowotworu i aktywności rozrostów układu chłonnego, w tym w CLL [9, 10]. Mniejsze zastosowanie w bieżącej praktyce klinicznej mają sCD23 i TK. Źródłem surowiczego sCD23 jest złuszczaający się z powierzchni limfocytów CLL antygen CD23. Wykazano, że jego podwyższony poziom surowiczy jest związany z szybkim podwojeniem się limfocytozy krwi obwodowej i szybką progresją choroby [11]. We krwi chorych na CLL stwierdza się też podwyższone stężenie izoformy 1 kinazy tymidylowej (TK1), które wykazuje współzależność z aktywnością proliferacyjną komórek nowotworowych, dużą masą nowotworu i jego szybką progresją oraz ze stanem mutacyjnym  $IgV_H$  [12, 13].

Nieobecność mutacji w zakresie  $IgV_H$ , obecnie definiowana jako stopień homologii  $\geq 98\%$  z sekwencją zarodkową tego genu, jest uważana za jeden z najważniejszych niezależnych czynników złego rokowania co do długości wolnego od progresji i całkowitego przeżycia chorych na CLL, co zostało wykazane w licznych badaniach. W szczególności szacuje się, że pacjenci ze zmutowanym  $IgV_H$  żyją średnio 25 lat, podczas gdy nieobecność tych mutacji wiąże się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby, wcześniejszą koniecznością rozpoczęcia leczenia, a średnie przeżycie skraca się do 8 lat [14–17]. Badanie stanu zmutowania  $IgV_H$  jest jednak możliwe do wykonania tylko w wyspecjalizowanym laboratorium i w chwili obecnej jest trudno dostępne dla celów rutynowej praktyki klinicznej. Dlatego też poszukuje się pośrednich wskaźników łatwiejszych do oznaczenia w laboratorium diagnostycznym. Do takich wskaźników zalicza się ekspresję w limfocytach CLL antygenów ZAP-70 i CD38.

Do najważniejszych czynników złego rokowania w CLL należy ekspresja wewnątrzkomórkowego białka ZAP-70 ( $\xi$ -associated protein). Jest to kinaza tyrozynowa należąca do rodziny kinaz syk o masie cząsteczkowej 70 kDa. Fizjologicznie występuje w limfocytach T i komórkach NK, gdzie wiąże się z łańcuchem  $\xi$  kompleksu receptora T (T-cell receptor, TCR) wzmacniając przekazywanie sygnałów prowadzących do przeżycia i proliferacji. W komórkach CLL ZAP-70 bierze udział w przekazywaniu sygnałów otrzymywanych za pośrednictwem receptora B (B-cell receptor, BCR), uczestnicząc w ten sposób w odpowiedzi limfocytów białaczkowych na antygeny własne i obecne w środowisku, co uruchamia mechanizmy prowadzące do ich proliferacji i przeżycia. Liczne badania wykazały, że ekspresja ZAP-70, oznaczana za pomocą cytofluorometrii, jest silnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym co do wolnego od progresji i całkowitego przeżycia chorych na CLL [18–21]. Należy tu jednak podkreślić, że niektóre badania nie wykazały znaczenia ekspresji ZAP-70 jako niezależnego czynnika rokowniczego co do całkowitego przeżycia, szczególnie w zaawansowanych stadiach choroby [22]. Bardzo istotną obserwacją jest wykazanie silnego związku pomiędzy ekspresją ZAP-70 a nieobecnością mutacji genu  $IgV_H$ . Pozwala to wykorzystać, z ok. 90-procentową czułością i specyficznością, badanie ekspresji omawianego

antygeny do oceny stanu zmutowania tego genu [19]. Wprowadzenie tego markera do rutynowej praktyki klinicznej wymaga jednak dalszych badań nad wystandaryzowaniem jego oznaczania metodą cytometrii przepływową.

Ekspresja ZAP-70 wykazuje także związek z antygenem CD38, posiadającym również znaczenie rokownicze w CLL. CD38 jest glikoproteiną błonową o właściwościach enzymatycznych, obecną na limfocytach i komórkach niehematopoetycznych i uczestniczącą w przekazywaniu sygnałów promujących przeżycie, proliferację oraz hamujących apoptozę, a po połączeniu się z ligandem, jakim jest antygen CD31 obecny na komórkach podścieliska i tzw. komórkach typu pielęgniarek, także w interakcjach międzykomórkowych [23, 24]. Ekspresja CD38 na powierzchni limfocytów CLL jest związana z krótszym przeżyciem całkowitym i wolnym od progresji oraz z gorszą odpowiedzią na leczenie [25–31]. Ekspresja ta wykazuje zarówno związek z nieobecnością mutacji genu  $IgV_H$ , jak i z występowaniem antygeny ZAP-70 [27, 32, 33]. Szczególnie interesujący jest związek pomiędzy CD38, a ZAP-70. Zgodność ekspresji obu tych białek wykazano u ponad 80% chorych na CLL [32, 33]. Ich związek czynnościowy został niedawno wyjaśniony przez Deaglio i wsp. Wykazali oni m.in., że komórki CLL posiadające oba te antygeny charakteryzują się dużą zdolnością migracji pod wpływem chemokiny SDF-1 $\alpha$  (stroma-derived factor 1 $\alpha$ , czynnik pochodzący z podścieliska) produkowany przez komórki podścieliska szpiku kostnego i komórki typu pielęgniarek. Pobudzenie antygeny CD38 przez jego połączenie z odpowiednim ligandem prowadzi do fosforylacji ZAP-70, a przewodzenie sygnałów za pośrednictwem CD38 jest zależne od ekspresji ZAP-70 [34]. Obserwacje te pozwalają zrozumieć, co się często podkreśla, dlaczego łączne oznaczenie ekspresji ZAP-70 i CD38 ma większą wartość rokowniczą niż osobne badanie każdego z tych czynników [34–38]. Wprowadzenie oznaczania CD38 do rutynowej praktyki klinicznej wymaga jednak, podobnie jak ZAP-70, standaryzacji metod jego oznaczania. Należy tu podkreślić, że nie ma w piśmiennictwie zgodności co do progowego odsetka komórek z wykrywalnym CD38, powyżej którego populację limfocytów należy traktować jako pozytywną pod względem jego ekspresji. Większość autorów przyjmuje granicę 30%, choć niektórzy obniżają ją do wartości 20% lub nawet mniejszej [25–30]. Podkreśla się ponadto zmienność ekspresji tego antygeny w czasie trwania choroby [39]. Niektóre badania wykazały też jej współzależność z innymi znanymi czynnikami rokowniczymi, jak surowicze stężenie  $\beta$ 2-mikroglobuliny i aktywność LDH oraz zakwestionowały niezależność jej wartości prognostycznej w CLL [25].

Z uwagi na silny związek ekspresji ZAP-70, CD38 i nieobecności mutacji genu  $IgV_H$ , omawiane antygeny traktowane są jako pośrednie wskaźniki stanu zmutowania tegoż genu. Nasuwa to z kolei pytanie o ich wzajemną zależność oraz o siłę ich wartości rokowniczej co do długości przeżycia całkowitego i wolnego od progresji. Niedawno opublikowana wieloczynnikowa analiza przeżycia wolnego od progresji, rozumianego jako czas od rozpoznania do rozpoczęcia leczenia grupy 705 chorych na CLL w różnych stadiach zaawansowania wg Rai wykazała, że największą siłą rokowniczą posiada ekspresja ZAP-70. Stan zmutowania  $IgV_H$  zachował swoje niezależne znaczenie rokownicze jedynie w grupie pacjentów nie wykazujących ekspresji ZAP-70, na-

tomiast oznaczenie CD38 nie wносиło istotnych dodatkowych informacji w tym zakresie [40].

Poszukując innych pośrednich wskaźników stanu zmutowania  $IgV_H$  zwrócono uwagę na ekspresję genu lipazy lipoproteinowej (LPL) oraz ADAMS29 (a disintegrin and metalloproteinase 29, dezintegryna i metaloproteinaza 29). Wykazano, że iloraz zawartości mRNA tych genów (iloraz L/A) był niezależnym czynnikiem rokowniczym co do długości przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń (event-free survival) nie tylko w całej grupie chorych oraz u pacjentów w stadium A wg Bineta, ale też, w odróżnieniu od ekspresji ZAP-70, w podgrupie chorych w stadium B i C. Zgodność pomiędzy wysokim wskaźnikiem L/A, a nieobecnością mutacji  $IgV_H$  wynosiła natomiast 92% [22].

Jak już wspomniano wcześniej, stan zmutowania genu  $IgV_H$  oraz jego pośrednie markery: ekspresja ZAP-70 i CD38, uważane są za najistotniejsze czynniki złego rokowania co do ryzyka progresji CLL i krótkiego przeżycia chorych, jednak wprowadzenie ich do praktyki klinicznej wymaga uproszczenia i standaryzacji metodyki ich oznaczania. W chwili obecnej wykonanie tych oznaczeń jest zalecane szczególnie u młodszych chorych z długim oczekiwanym czasem przeżycia, zwłaszcza kwalifikowanych do intensywnych procedur leczniczych, jak allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych.

W ostatnim czasie stwierdzono niekorzystne znaczenie rokownicze dodatniego bezpośredniego odczynu antyglobulinowego (BTA) u ok. 1/3 pacjentów w różnych okresach choroby, a któremu nie zawsze towarzyszy niedokrwistość hemolityczna. Wykazano, że dodatni BTA istotnie skraca przeżycie wolne od progresji i całkowite. Ryzyko wystąpienia niedokrwistości hemolitycznej zwiększa leczenie chlorambucylem lub fludarabiną w monoterapii, natomiast podawanie fludarabiny z cyklofosfamidem działa ochronnie w tym zakresie [41].

Należy tu też wspomnieć, że już od lat osiemdziesiątych zwraca się uwagę na niekorzystne znaczenie rokownicze rozlanego typu nacieczenia szpiku kostnego co do dynamiki rozwoju choroby oraz długości przeżycia, a pierwsze opublikowane wyniki badań sugerowały jego niezależną wartość prognostyczną w tym zakresie [42–44]. Dlatego też przez wiele lat zalecano badanie szpiku kostnego drogą trepanobiopsji w ramach wstępnej oceny stopnia zaawansowania choroby oraz ustalenia ryzyka jej szybkiej progresji. Jednak późniejsze badania wykazały związek typu nacieczenia szpiku kostnego z innymi zjawiskami mającymi znaczenie prognostyczne, takimi jak stadium zaawansowania klinicznego, ekspresja antygenu CD38 czy nasilenie angiogenezy szpiku oraz podważyły wartość tego wskaźnika jako niezależnego czynnika rokowniczego w CLL [5, 25, 45, 46].

## **Znaczenie rokownicze niektórych zjawisk biologicznych w CLL**

### ***Prolifерacja, przeżycie i apoptoza limfocytów CLL***

W większości nowotworów narządowych i hematologicznych wysoka aktywność proliferacyjna komórek złośliwych jest związana z dużą agresywnością choroby, a badanie tej aktywności, np. za pomocą cytofluorometrycznego określania zawartości

DNA, inkorporacji bromodeoksyurydyny (BrdU) lub tymidyny  $^3\text{H}$  ( $^3\text{H-T}$ ) lub też oznaczania ekspresji antygenów Ki-67 lub PCNA, należy do panelu rutynowych badań diagnostycznych. Cechą charakterystyczną limfocytów CLL jest natomiast ich zatrzymanie w fazie G0/G1 cyklu komórkowego, co powoduje, że u zdecydowanej większości pacjentów przeszło 90% komórek wykazuje haploidalną (1N) zawartość DNA, a odsetek komórek inkorporujących  $^3\text{H-T}$  i BrdU oraz wykazujących ekspresję Ki-67 i PCNA jest niski. Z tego też powodu badania nad znaczeniem klinicznym aktywności proliferacyjnej limfocytów CLL są trudne do wykonania. Istnieją co prawda doniesienia, że wyższa aktywność podziałowa tych komórek jest związana z większą agresywnością choroby [47–51], jednak określenie przydatności klinicznej określania aktywności podziałowej limfocytów CLL wymaga dalszych badań.

Powszechnie uważa się, że w patogenezie CLL istotną rolę odgrywa akumulacja jej komórek  $\text{CD5}^+/\text{CD19}^+/\text{CD23}^+$  w wyniku zahamowania ich apoptozy *in vivo*. Roli tego zjawiska w kształtowaniu obrazu klinicznego omawianej choroby poświęcono więc liczne badania. Nie pozwoliły one jednak, jak dotychczas, na wyodrębnienie czynnika rokowniczego o jednoznacznej wartości klinicznej. Opublikowano obserwacje wskazujące, że wydłużone przeżycie limfocytów *in vitro* towarzyszy bardziej agresywnemu przebiegowi choroby [52], jednak interpretując wyniki badań nad apoptozą limfocytów CLL w hodowli należy mieć na względzie, że ich żywotność w tych warunkach jest zmniejszona i nie odzwierciedla ich wydłużonego przeżycia *in vivo*. Dlatego też poszukuje się pośrednich wskaźników zahamowania apoptozy limfocytów *in vivo* mogących mieć znaczenie rokownicze i/lub predykcyjne w tej chorobie. Liczne badania poświęcono w szczególności ekspresji wewnątrzkomórkowych czynników aktywujących lub hamujących to zjawisko, przede wszystkim białkom z rodziny BCL-2. Jak wiadomo, komórki CLL wykazują zwiększoną z nie do końca wyjaśnionych przyczyn ekspresję BCL-2, które chroni je przed apoptozą. Niektórzy autorzy zwrócili uwagę na związek pomiędzy jego wysoką ekspresją a agresywnym przebiegiem choroby, krótkim przeżyciem i opornością na analogi puryn, co jednak nie zostało potwierdzone w innych doniesieniach [52–58]. Obecnie większą wartość rokowniczą oraz predykcyjną co do odpowiedzi na fludarabinę przypisuje się stosunkowi ekspresji czynników Bcl-2/Bax na poziomie genu i/lub białka [52, 58, 59]. Zwraca się też uwagę na znaczenie ekspresji innego białka antyapoptotycznego z tej rodziny, Mcl-1, którego ekspresja jest pobudzana w wyniku konstytucyjnej aktywacji szlaku sygnalizacyjnego PI3K/Akt [60]. Stwierdzono, że niska ekspresja jego genu korzystnie rokuje co do długości przeżycia [61], a jego wysoki poziom wewnątrzkomórkowy jest związany z opornością na monoterapię fludarabiną i cyklofosfamidem [62] oraz z krótkim trwaniem odpowiedzi na leczenie skojarzone pentostatyną, cyklofosfamidem i rituksymabem [63]. Ta wartość predykcyjna ekspresji Mcl-1 co do odpowiedzi *in vivo* na fludarabinę/fludarabinę z cyklofosfamidem nie została jednak potwierdzona przez późniejsze badania [64]. Niedawno wykazano, że wysoka zawartość Mcl-1 wykazuje, w odróżnieniu od Bcl-2 i Bax, ścisły związek z niezmutowanym genem  $\text{IgV}_\text{H}$  oraz ekspresją ZAP-70 i CD38, a stosunek ekspresji Mcl-2/Bax okazał się najsilniejszym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym co do czasu do rozpoczęcia leczenia. Należy tu jednak podkreślić, że

w analizie wieloczynnikowej uwzględniającej stadium zaawansowania klinicznego, ekspresję CD38 i stan zmutowania genu  $IgV_H$ , wewnątrzkomórkowa zawartość żadnego z badanych białek rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bax i Mcl-1) nie wykazywała niezależnego znaczenia prognostycznego ani co do długości okresu przed rozpoczęciem leczenia, ani co do całkowitego przeżycia pacjentów [53].

Jak wspomniano wyżej, ekspresja Mcl-1 jest pobudzana w wyniku konstytucyjnej aktywacji szlaku PI3K/Akt, obecnie uważanego za jeden z najważniejszych wewnątrzkomórkowych mechanizmów odpowiedzialnych za przedłużone przeżycie limfocytów CLL [65]. Jednym z czynników aktywujących kinazę Akt jest z kolei produkt protoonkogeny TCL-1 [66], którego niska ekspresja wydaje się związana z wyższym prawdopodobieństwem uzyskania całkowitej remisji po leczeniu pentostatyną, cyklofosfamidem i rituksymabem [67].

Trudności w badaniach nad rolą czynników wpływających na przeżycie limfocytów CLL w kształtowaniu obrazu klinicznego tej choroby wynikają między innymi z dużej złożoności mechanizmów wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w jego regulację. Niektóre z nich wpływają tak na przeżycie komórek białaczkowych, jak i na ich aktywność podziałową w sposób odmienny niż to ma miejsce w nowotworach narządowych. Przykładem jest białko  $p27^{Kip1}$ , należące do rodziny inhibitorów kinaz cyklinozależnych (cdk).  $p27^{Kip1}$  hamuje aktywność enzymatyczną większości znanych kompleksów utworzonych przez cdk i ich jednostki aktywujące zwane cyklinami, przez co utrzymuje je w stanie nieaktywnym i hamuje aktywność podziałową komórek. Białko  $p27^{Kip1}$  jest więc uważane za czynnik antyproliferacyjny. Ponadto wykazano, że to białko zaangażowane jest też w przeżycie komórek, choć dane doświadczalne na temat jego wpływu na apoptozę (pobudzający czy hamujący) są rozbieżne [68, 69]. Obniżona, wskutek zwiększonej proteolizy, zawartość omawianego białka w komórkach guza koreluje z większą agresywnością kliniczną i/lub histologiczną zdecydowanej większości nowotworów narządowych oraz ma w nich niekorzystne znaczenie rokownicze. W CLL natomiast podwyższona ekspresja  $p27^{Kip1}$  w limfocytach białaczkowych jest związana z wczesną progresją choroby i szybszą koniecznością rozpoczęcia leczenia w stosunku do pacjentów z niską wewnątrzkomórkową zawartością tego białka [70, 71].

Zdolność replikacyjna populacji komórkowej jest ściśle związana z długością telomerów, które ulegają skracaniu przy każdym podziale komórkowym, czemu przeciwdziałają m.in. aktywność enzymu zwanego telomerazą. W limfocytach CLL, pomimo wzmożonej aktywności telomerazy, telomery są krótsze niż w limfocytach B zdrowych osób [72]. Wykazano ponadto związek pomiędzy mniejszą długością telomerów, a niezmutowanym stanem genu  $IgV_H$ , ekspresją CD38 i ZAP-70 oraz obecnością zaburzeń chromosomowych, szczególnie aberracji o niekorzystnym znaczeniu rokowniczym i aberracji złożonych [72–74]. Stwierdzono, że mniejsza długość telomerów posiada niekorzystne znaczenie rokownicze co do długości przeżycia całkowitego oraz wolnego od progresji i pogarsza rokowanie związane z niezmutowaniem  $IgV_H$  [72–74]. Określenie długości telomerów może więc stać się w przyszłości cennym uzupełnieniem panelu badań diagnostycznych pozwalających na wyodrębnienie pacjentów z wy-



sokim ryzykiem progresji choroby i mogącym odnieść korzyść z wczesnego rozpoczęcia leczenia.

### *Angiogeneza szpiku kostnego i jej pośrednie wskaźniki*

W rozwoju nowotworów istotną rolę odgrywa ich unaczynienie zapewniające podaż tlenu i substancji odżywczych do komórek guza. Wykształca się ono w procesie zwanym angiogenezą. U chorych na CLL proces ten dokonuje się m.in. w szpiku kostnym, gdzie stwierdza się zwiększoną gęstość naczyń w stosunku do szpiku osób zdrowych [45, 75–77]. Wykazano, że ta gęstość wykazuje związek ze stadium zaawansowania klinicznego, aktywnością proliferacyjną komórek utkania szpikowego oraz rozlanym typem jego nacieczenia [45, 75], oraz ma niekorzystne znaczenie rokownicze co do okresu wolnego od progresji, choć tego znaczenia nie potwierdzono w analizie wieloczynnikowej [77]. Z uwagi na trudności związane z bezpośrednim oznaczaniem angiogenezy (konieczność pobierania materiału drogą trepanobiopsji, a następnie wykonywania specjalistycznych i nie wystandaryzowanych oznaczeń immunohistochemicznych) podejmowano próby badania znaczenia rokowniczego pośrednich wskaźników tego zjawiska, przede wszystkim surowiczego stężenia cytokin zaangażowanych w tworzenie nowych naczyń. Do najważniejszych cytokin proangiogennych należy VEGF (vascular endothelial growth factor, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego). Zaobserwowano, że podwyższone stężenie VEGF u chorych we wczesnych stadiach CLL jest związane z ryzykiem wczesnej progresji, jednak wartość rokownicza tej cytokiny nie została wykazana w analizie wieloczynnikowej uwzględniającej inne znane wskaźniki prognostyczne [77, 78]. Należy tu mieć na względzie, że VEGF jest cytokiną pleiotropową, której źródłem są nie tylko limfocyty białaczkowe, ale też liczne inne komórki nie zaangażowane bezpośrednio w angiogenezę (limfocyty T, płytki krwi, makrofagi, komórki podścieliska, komórki białaczkowe). Próbowano więc określić współzależność pomiędzy przebiegiem choroby a zawartością tej cytokiny i jej receptorów na komórkach białaczkowych. Wykazano, że zwiększone stężenie receptora typu 2 dla VEGF (VEGF-R2) na limfocytach CLL jest związane z krótszym przeżyciem pacjentów, także po uwzględnieniu wpływu stadium zaawansowania klinicznego i poziomu  $\beta$ 2-mikroglobuliny [79]. Natomiast odwrotny wpływ na całkowite przeżycie miała wewnątrzkomórkowa zawartość omawianej cytokiny: jej niska wartość u chorych w początkowych stadiach choroby rokowała pod tym względem niekorzystnie [80]. Badano też wartość rokowniczą innej kluczowej cytokiny proangiogennej: bFGF (basic fibroblasts growth factor, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów). W przeciwieństwie do VEGF, głównym źródłem krążącego bFGF wydają się komórki białaczkowe [81, 82]. Według niektórych doniesień jego podwyższony poziom surowiczy wykazywał związek z zaawansowaniem klinicznym choroby, co jednak nie zostało potwierdzone przez inne obserwacje [82–84]. Podobne rozbieżności istnieją odnośnie zawartości bFGF w komórkach białaczkowych [81, 82]. Opisywano też niekorzystny wpływ podwyższonego surowiczego poziomu tej cytokiny na dynamikę rozwoju choroby [83, 85]. Wśród innych badanych cytokin zaangażowanych w tworzenie naczyń

krwionośnych warto zwrócić uwagę na angiogenninę, substancję o właściwościach antyangiogennych, której podwyższony poziom surowicy jest związany z dłuższym przeżyciem wolnym od progresji [86]. Autorzy tego doniesienia nie stwierdzili jednak korelacji pomiędzy stężeniem angiogenniny a mikrowaskularyzacją szpiku, co uzasadnia ostrożność w traktowaniu surowiczego stężenia cytokin zaangażowanych w angiogenezę jako wskaźnika neowaskularyzacji szpiku. Biorąc więc pod uwagę wspomniane ograniczenia metodologiczne oraz rozbieżności w danych piśmiennictwa dotyczące związku pomiędzy nasileniem angiogenezy szpiku a przebiegiem klinicznym CLL, badanie tego zjawiska jak dotychczas nie znalazło zastosowania w codziennej praktyce klinicznej.

### ***Ekspresja niektórych antygenów powierzchniowych oraz cząsteczek adhezyjnych***

Niekorzystne rokowanie w CLL może mieć ekspresja na powierzchni limfocytów białaczkowych niektórych markerów typowych dla linii mieloidalnej. W szczególności wykazano to dla antygenów CD13, CD14 i CD33 [87, 88]. Związek z agresywnym przebiegiem choroby ma też występowanie antygeny HLA-G [89]. Liczne badania wykazały, że w rozwoju, rozprzestrzenianiu i kształtowaniu obrazu klinicznego wielu nowotworów narządowych i hematologicznych istotny udział bierze też rodzina białek zwana cząsteczkami adhezyjnymi, uczestniczącymi m.in. w interakcjach międzykomórkowych. Oznaczanie ich ekspresji oraz stężenia surowiczego ich postaci rozpuszczalnych było przedmiotem wielu doniesień. Na szczególną uwagę zasługuje ICAM-1 (intracellular adhesion molekuła, cząsteczka adhezji międzykomórkowej, CD54), obecna na komórkach śródbłonna naczyniowego, fibroblastach, komórkach dendrytycznych, komórkach układu krwiotwórczego i nerwowego. Wykazano, że podwyższenie surowiczego stężenia jej formy rozpuszczalnej (sICAM-1) ma związek ze stadiem zaawansowania klinicznego i innymi czynnikami niekorzystnego rokowania oraz z ryzykiem szybkiej progresji choroby [90, 91]. Podobny związek z masą nowotworu, innymi czynnikami złego rokowania oraz z ryzykiem progresji CLL stwierdzono też dla innej cząsteczki adhezyjnej, sVCAM-1 (soluble vascular cell adhesion molecule-1, rozpuszczalna cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych) [91].

### **PODSUMOWANIE**

Badania czynników rokowniczych i predykcyjnych w CLL odgrywają dużą rolę w optymalizacji postępowania leczniczego w tej chorobie. Szczególnie istotne jest prognozowanie odpowiedzi na standardowe programy terapeutyczne, a także wyodrębnienie tych pacjentów z małą masą nowotworu, którzy odnieśliby korzyść z wczesnego rozpoczęcia leczenia lub z jego intensyfikacji. Liczne opublikowane prace pozwoliły na identyfikację licznych wskaźników laboratoryjnych lub zjawisk biologicznych mających związek z przebiegiem klinicznym choroby, jednak tylko niektóre z nich weszły do repertuaru badań obowiązkowych lub zalecanych w ramach rutynowej diagnostyki. Należą do nich przede wszystkim badania cytogenetyczne metodą

FISH, co jest istotne nie tylko ze względu na możliwość określenia ryzyka szybkiej progresji choroby, ale przede wszystkim na prognozowanie wrażliwości na analogi puryn. Zaleca się też określenie ekspresji antygenów CD38, ZAP-70 i stanu mutacyjnego genu IgV<sub>H</sub>, szczególnie u młodszych chorych mogących być kandydatami do leczenia według agresywnych schematów leczniczych, np. allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych. Problem wyodrębnienia takich czynników złego rokowania, które uzasadniłyby wcześniejsze rozpoczęcie leczenia cytotatycznego, niż przewidują obecnie obowiązujące standardy postępowania, wymaga natomiast dalszych badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana A, Levy R, Pasternak. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; **46**: 219-234.
2. Binet JL, Auquier A, Dighiero G i wsp. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; **48**: 198-206.
3. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte-doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; **62**: 567-575.
4. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D. i wsp. 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.
5. Bergmann MA, Eichhorst BF, Bush R. i wsp. Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): results of the CLL-1 protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood* 2007; **110**: 193a (abstr. 625).
6. Palacz A, Korycka A. Diagnostyczne i rokownicze znaczenie badań cytogenetycznych w przewlekłej białaczce limfocytowej. *Acta Haematol Pol.* 2008; **3**: 443-459.
7. Robak T, Blonski JZ, Wawrzyniak E, i wsp. Activity of cladribine combined with cyclophosphamide in frontline therapy for chronic lymphocytic leukemia with 17p13.1/TP53 deletion: report from the Polish Adult Leukemia Group. *Cancer* 2009; **115**: 94-100.
8. Kujawski L, Ouillette P, Erba H i wsp. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **112**: 1993-2003.
9. Vives-Corrons JL, Rozman C, Pujades MA, Colomer D, Perez-Vila E, Anegon I, Gallart T, Vives-Puiggros J, Vinolas N, Montserrat E, Combined assay of adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase and lactate dehydrogenase in the early clinical evaluation of B-chronic lymphocytic leukemia. *Am J Haematol* 1988; **27**: 157-162.
10. Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H, Freireich EJ, O'Brien S, The serum  $\beta_2$ -microglobulin level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; **86** (suppl 1), 606a.
11. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron C, Stryckmans P, Delpesse G, Binet JL, Prognostic importance of serum levels of CD23 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996; **88**: 4259-4264.
12. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C i wsp. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **93**: 1732-1737.
13. Magnac C, Porcher R, Davi F i wsp. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003; **17**: 133-137.
14. Damle RN, Wasil T, Fais F i wsp. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1840-1847.

15. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 1848-1854.
16. Degan M, Bomben R, Bo MD i wsp. Analysis of IgV gene mutations in B cell chronic lymphocytic leukaemia according to antigen-driven selection identifies subgroups with different prognosis and usage of the canonical somatic hypermutation machinery. *Br J Haematol* 2004; **126**: 29-42.
17. Maloum K, Davi F, Merle-Beral H i wsp. Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; **96**: 377-379.
18. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z i wsp. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; **363**: 105-111.
19. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL i wsp. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 893-901.
20. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS i wsp. 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.
21. Crespo M, Bosch F, Villamor N i wsp. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1764-1775.
22. Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C i wsp. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; **106**: 650-657.
23. Deaglio S, Mallone R, Baj G i wsp. CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem Immunol* 2000; **75**: 99-120.
24. Matrai Z. CD38 as a prognostic factor in CLL. *Hematology* 2005; **10**: 39-46.
25. Domingo-Domenech E, Domingo-Claros A, Gonzales-Barca E i wsp. CD38 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 2002; **87**: 1021-1027.
26. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A i wsp. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 2633-2639.
27. Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV<sub>H</sub> mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **100**: 1404-1409.
28. Hsi ED, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Boldt D, Frey T, Loftus M, Hussein MA. Prognostic significance of CD38 and CD20 expression as assessed by quantitative flow cytometry in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **120**: 1017-1025.
29. Ibrahim S, Keating M, Do KA i wsp. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 181-186.
30. Thornton PD, Fernandez C, Giustolisi GM i wsp. CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J* 2004; **5**: 145-151.
31. Szemraj Z., Jamrozak K., Robak T. Antygen CD38 jako czynnik rokowniczy w B-komórkowej przewlekłej białaczce limfocytowej. *Acta Haematol Pol* 2007; **38**: 213-224.
32. Durig J, Nuckel H, Cremer M i wsp. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003; **17**: 2426-2434.
33. Schroers R, Griesinger F, Trumper I i wsp. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 750-758.
34. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S i wsp. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007; **110**: 4012-4021.
35. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N i wsp. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2005; **104**: 2124-2132.
36. Schroers R, Griesinger F, Trumper L i wsp. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 750-758.

37. Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A i wsp. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* 2006; **17**: 683-690.
38. D'Arena G, Tarnani M, Rurni C i wsp. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007; **82**: 787-791.
39. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE i wsp. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; **99**: 1023-1029.
40. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ i wsp. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **112**: 1923-1930.
41. Dearden C, Wade R, Else M, Richards S, Milligan D, Hamblin T, Catovsky D; UK National Cancer Research Institute (NCRI); Haematological Oncology Clinical Studies Group; NCRI CLL Working Group. The prognostic significance of a positive direct antiglobulin test in chronic lymphocytic leukemia: a beneficial effect of the combination of fludarabine and cyclophosphamide on the incidence of hemolytic anemia. *Blood* 2008; **111**: 1820-1826.
42. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM i wsp. Bone marrow histologic pattern - the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 1984; **64**: 642-648.
43. Pangalis GA, Boussiotis VA, Kittas C. B-cell chronic lymphocytic leukemia. Disease progression in 150 untreated stage A and B patients as predicted by bone marrow patterns. *Nouv Rev Fr Haematol* 1988; **30**: 373-375.
44. Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL i wsp. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica* 1994; **79**: 334-341.
45. Wołowiec D, Woźniak Z, Potoczek S i wsp. Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; **26**: 263-270.
46. Geisler CH, Hou-Jensen K, Jensen OM i wsp. The bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. Danish CLL Study Group. *Eur Journal of Haematol* 1996; **57**: 292-300.
47. Cordone I, Matutes E, Catovsky D. Monoclonal antibody Ki-67 identifies B and T cells in cycle in chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease activity. *Leukemia* 1992; **6**: 902-906.
48. Del Giglio A, O'Brien S, Ford RJ i wsp. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Lymphoma* 1993; **10**: 265-271.
49. Astsaturov IA, SamoiloVA RS, Iakhnina EI, Pivnik AV, Vorobiov AI. The relevance of cytological studies and Ki-67 reactivity to the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997; **26**: 337-342.
50. Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M i wsp. Prognostic value of S-phase white blood cell count in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1992; **6**: 47-51.
51. Del Giglio A, O'Brien S, Ford R i wsp. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in chronic lymphoid leukemia. *Blood* 1992; **79**: 2717-2720.
52. Aguilar-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M, Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer* 1996; **69**: 114-119.
53. Pepper C, Lin TT, Pratt G i wsp. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008; **112**: 3807-3817.
54. Thomas A, El Roubi S, Reed JC i wsp. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 1996; **12**: 1055-1062.
55. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 1996; **10**: 456-459.

56. Faderl S, Keating MJ, Do KA i wsp. Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2002; **16**: 1045-1052.
57. Pepper C, Bentley P, Hoy T, Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1996; **95**: 513-517.
58. Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 1997; **76**: 935-938.
59. Molica S, Dattilo A, Giulino C, Levato D, Levato L. Increased bcl-2/bax ratio in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with a progressive pattern of disease. *Haematologica* 1998; **83**: 1122-1124.
60. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008; **111**: 846-855.
61. Véronèse L, Tournilhac O, Verrelle P i wsp. Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2008; **22**: 1291-1293.
62. Kitada S, Andersen J, Akar S i wsp. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998; **91**: 3379-3389.
63. Awan FT, Kay NE, Davis ME i wsp. Mcl-1 expression predicts progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients treated with pentostatine, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood* 2009; **113**: 535-537.
64. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW i wsp. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 799-804.
65. Ringshausen I, Scheller F, Bogner C. et al. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase C $\delta$ . *Blood* 2002; **110**: 3741-3748.
66. Laine J, Künstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell*. 2000; **6**: 395-407.
67. Browning RL, Geyer SM, Johnson AJ i wsp. Expression of TCL-1 as a potential prognostic factor for treatment outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Res* 2007; **31**: 1737-1740.
68. Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997; **57**: 5441-5445.
69. Hiromura K, Pippin JW, Fero ML, Roberts JM, Shankland SJ. Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Journal of Clinical Invest* 1999; **103**: 597-604.
70. Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zittoun R, Ajchenbaum-Cymbalista F. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; **91**: 4694-4700.
71. Wołowiec D, Wojtowicz M, Ciszak L i wsp. High intracellular content of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in early- and intermediate stage B-cell chronic lymphocytic leukemia lymphocytes predicts rapid progression of the disease. *Eur J Haematol* 2009; **82**: 260-266.
72. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F i wsp. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004; **103**: 375-382.
73. Roos G, Kröber A, Grabowski P i wsp. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 2246-2252.
74. Ricca I, Rocci A, Drandi D i wsp. Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia* 2007; **21**: 697-705.
75. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2000; **14**: 1414-1418.
76. Molica S. Angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: methods of study, clinical significance and prognostic implications. *Leuk Lymphoma* 2001; **42**: 603-607.

77. Molica S, Vacca A, Ribatti D i wsp. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **100**: 3344-3351.
78. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1999; **107**: 605-610.
79. Ferrajoli A, Manshouri T, Estrov Z i wsp. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 795-799.
80. Aguayo A, O'Brien S, Keating M i wsp. Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; **96**: 768-770.
81. Menzel T, Rahman Z, Calleja E i wsp. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* 1996; **87**: 1056-1063.
82. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M i wsp. Bcl-2 expression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2001; **113**: 400-406.
83. Góra-Tybor J, Błoński JZ, Robak T. Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm* 2003; **12**: 167-171.
84. Duensing S, Atzpodien J. Increased intracellular and plasma levels of basic fibroblast growth factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; **85**: 1978-1980.
85. Wołowiec D, Dybko J, Wróbel T i wsp. Circulating sCD138 and some angiogenesis-involved cytokines help to anticipate the disease progression of early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Med. Inflamm.* 2006; **vol. 2006**, Art. ID 42394, 1-6.
86. Molica S, Vitelli G, Levato D i wsp. Serum angiogenin is not elevated in patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia but is prognostic factor for disease progression. *Eur J Haematol.* 2004; **73**: 36-42.
87. Molica S, Dattilo A, Alberti A. Myelomonocytic associated antigens in B-chronic lymphocytic leukemia: Analysis of clinical significance. *Leuk Lymphoma* 1991; **5**: 139-144.
88. Callea V, Morabite P, Oliva BM i wsp. Surface CD14 positivity in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to clinical outcome. *Br J Haematol* 1999; **107**: 347-352.
89. Nuckel H, Rebmann V, Durig J, Dührsen U, Grosse-Wilde H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; **105**: 1694-1698.
90. Christiansen I, Gidlof C, Wallgren AC, Simonsson B, Totterman TH. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 are increased in chronic B-lymphocytic leukemia and correlate with clinical stage and prognostic markers. *Blood* 1994; **84**: 3010-3016.
91. Christiansen I, Sundstrom C, Totterman TH. Elevated serum levels of soluble cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) closely reflect tumour burden in chronic B-lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1998; **103**: 1129-1137.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.04.2009 r. i została zakwalifikowana do druku 30.04.2009 r.

**Adres do korespondencji:**

Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku  
Akademia Medyczna we Wrocławiu  
ul. Pasteura 4  
50-367 Wrocław