

STRESZCZENIE

Wstęp. W patogenezie PBL kluczową rolę odgrywają zaburzenia apoptozy prowadzące do patologicznego wydłużenia przeżycia komórek białaczkowych. Zawartość uczestniczącego w regulacji cyklu komórkowego białka p27^{Kip1} ulega zwiększeniu w komórkach PBL.

Cel pracy. Celem pracy jest skonfrontowanie wewnątrzkomórkowej zawartości białka p27^{Kip1} z przebiegiem klinicznym choroby, odsetkiem wczesnoapoptotycznych komórek białaczkowych, ekspresją markerów aktywacji (CD69) i proliferacji (CD71) oraz klasycznymi czynnikami rokowniczymi PBL: ekspresją ZAP-70, stężeniem LDH i B2-M.

Materiał i metody. Do badania włączono 36 pacjentów Poradni Hematologicznej Kliniki Hematologii w Rzeszowie z rozpoznaniem PBL (61% mężczyzn), nie spełniających kryteriów rozpoczęcia leczenia. U chorych oceniono zawartość białka p27^{Kip1} w limfocytach białaczkowych metodą Western-Blotting i wykonano badanie immunofenotypowe krwi obwodowej z uwzględnieniem ekspresji markera wczesnej apoptozy CMXRos w limfocytach CD19⁺ dla oceny częstości występowania wczesnoapoptotycznych komórek białaczkowych a następnie obserwowano prospektywnie przebieg choroby w okresie 1-49 (mediana 36) miesięcy.

Wyniki. U 16 pacjentów stwierdzono progresję choroby: u 4 wyłącznie z powodu pojawienia się wskazania do leczenia, u 7 z powodu pojawienia się wskazania do leczenia i zwiększenia stopnia zaawansowania klinicznego choroby, u 5 wyłącznie z powodu zwiększenia stopnia zaawansowania klinicznego choroby. Wewnątrzkomórkowa zawartość p27^{Kip1} była wyższa w grupie pacjentów z progresją PBL ($p < 0,0001$), ze zwiększeniem stopnia zaawansowania choroby niezależnie od wystąpienia wskazań do rozpoczęcia leczenia ($p < 0,0001$) lub przy ich braku ($p = 0,0002$). Zwiększenie stopnia zaawansowania choroby było obserwowane u 55,56% pacjentów z wysoką, natomiast nie wystąpiło u pacjentów z niską zawartością p27^{Kip1} ($p = 0,004$); progresja choroby wystąpiła odpowiednio u 76,47% i 11,76% pacjentów ($p = 0,0004$). Przeżycie wolne od progresji choroby było krótsze u pacjentów z wysoką niż u pacjentów z niską zawartością p27^{Kip1}: mediana czasu do progresji choroby wynosiła odpowiednio 36,17 miesięcy i nie została osiągnięta w tej ostatniej grupie ($p = 0,0042$). Częstość występowania wczesnoapoptotycznych komórek białaczkowych (o fenotypie CD19⁺/glyA⁻/CMXRos⁻) nie miała wpływu na progresję choroby ani na czas przeżycia wolnego od progresji choroby. Ekspresję ZAP-70 $\geq 20\%$ w limfocytów białaczkowych stwierdzono u 8 (22%)

badanych [mediana 9,8% (0,81-60,9%)]; pacjenci, u których rozpoznano progresję choroby, mieli wyższą ekspresję ZAP-70, niż pozostali ($p=0,0381$). Czas przeżycia wolnego od progresji choroby był krótszy u pacjentów z ekspresją ZAP-70 $\geq 20\%$ ($p=0,0067$). Stężenie LDH było zwiększone u 12 (33%) badanych [mediana 460,5 (293–1284) U/l; zakres normy 240-480 U/l]; pacjenci, u których rozpoznano progresję choroby, mieli wyższe stężenie LDH niż pozostali ($p=0,0135$). Czas przeżycia wolnego od progresji choroby był krótszy u pacjentów z wysokim stężeniem LDH ($p=0,0038$). Nie wykazano związku stężenia B2-M, CD69 ani CD71 na komórkach białaczkowych z progresją choroby, ani z długością czasu przeżycia wolnego od progresji choroby.

Dyskusja. Wewnątrzkomórkowa zawartość białka p27^{Kip1} stanowi potencjalny czynnik prognostyczny progresji choroby u pacjentów z niskim lub pośrednim stopniem zaawansowania klinicznego PBL, którzy nie są kwalifikowani do leczenia cytostatycznego. Wyodrębnienie wśród nich chorych z wysokim ryzykiem progresji jest więc istotne z klinicznego punktu widzenia. Inkorporacja p27^{Kip1} do istniejących indeksów prognostycznych pomogłaby jeszcze lepiej odróżnić grupę pacjentów, którzy najprawdopodobniej nie ulegną progresji od tych, którzy będą wymagali leczenia. Nie wykazano związku pomiędzy odsetkiem wczesnoapoptotycznych limfocytów białaczkowych a wewnątrzkomórkową zawartością p27^{Kip1}, co może wynikać z małej liczebności grupy badanej.

Wnioski. Zawartość białka p27^{Kip1} w komórkach PBL niekorzystnie wpływa na przebieg kliniczny PBL, zwiększając ryzyko wystąpienia progresji choroby oraz skracając czas przeżycia wolnego od progresji choroby. Częstość występowania wczesnoapoptotycznych komórek białaczkowych CD19⁺/glyA⁻/CMXRos⁻ nie ma związku z wewnątrzkomórkową zawartością białka p27^{Kip1}, ani z wybranymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi, nie wpływa na występowanie progresji choroby, ani na czas przeżycia wolnego od progresji choroby. Spośród badanych klasycznych czynników prognostycznych przebiegu PBL (stężenie B2-M i LDH, ekspresja ZAP-70, CD69 i CD71 na komórkach białaczkowych) jedynie ekspresja ZAP-70 i wysokie stężenie LDH miały wpływ na zwiększenie ryzyka progresji PBL oraz na skrócenie czasu przeżycia wolnego od progresji choroby

SUMMARY

Introduction. Dysregulation of apoptosis leading to pathological prolongation of cell survival plays a key role in the pathogenesis of CLL. The content of p27^{kip1} protein involved in the regulation of the cell cycle is increased in CLL cells.

Aim. The aim of the study is to confront the intracellular content of the p27^{kip1} protein with the clinical course of the disease, the percentage of early apoptotic leukemic cells, the expression of activation (CD69) and proliferation (CD71) markers as well as the classic prognostic factors of CLL: ZAP-70 expression, LDH and B2-M concentration.

Material and methods. 36 patients of the Hematology Outpatient Clinic in Rzeszów diagnosed with CLL (61% men), who did not meet the treatment initiation criteria, were included into the study. Patients were evaluated with use of peripheral blood immunophenotyping and p27^{kip1} protein content assessment in leukemic lymphocytes by Western-Blotting. The expression of CMXRos, marker of early apoptosis, was used to assess the percentage of early-apoptotic leukemic cells. The course of the disease was prospectively followed during 1-49 (median 36) months.

Results. Disease progression was observed in 16 patients: in 4 only due to the appearance of an indication for treatment, in 7 due to the appearance of an indication for treatment and an increase in the clinical stage of CLL, in 5 only due to an increase in the clinical stage. The intracellular content of p27^{kip1} was higher in the group of patients with CLL progression ($p < 0.0001$), patients with increasing clinical stage, regardless of the presence of indications for treatment initiation ($p < 0.0001$) or in the absence of such indications ($p = 0.0002$). The progression of the disease stage was observed in 55.56% of patients with high p27^{kip1} content, but it was not observed in patients with low p27^{kip1} content ($p = 0.004$); disease progression occurred in 76.47% and 11.76% of above groups, respectively ($p = 0.0004$). Progression-free survival was shorter in patients with high than in patients with low p27^{kip1} content: median time to disease progression was 36.17 months and was not reached in the other group, respectively ($p = 0.0042$). The percentage of early apoptotic leukemic cells (CD19⁺/glyA⁻/CMXRos⁻ phenotype) had effect on neither disease progression nor progression-free survival. ZAP-70 expression $\geq 20\%$ in leukemic lymphocytes was found in 8 (22%) subjects [median 9.8% (0.81-60.9%)]; patients with disease progression had higher ZAP-70 expression than others ($p = 0.0381$). Progression-free survival was shorter in patients with ZAP-70 expression $\geq 20\%$ ($p = 0.0067$).

The concentration of LDH was increased in 12 (33%) subjects [median 460.5 (293–1284) U/L; normal range 240-480 U/L], patients with diagnosed disease progression had a higher LDH concentration than the other ($p=0.0135$). Progression-free survival was shorter in patients with high LDH concentration ($p=0.0038$). There was no correlation between B2-M concentration, ZAP-70, CD69 and CD71 expression on leukemic cells and disease progression or progression-free survival.

Discussion. The intracellular protein content p27^{kip1} is a potential predictive factor for disease progression in patients with low or intermediate clinical stage of CLL, who are not eligible for therapy. The identification of patients with a high risk of progression is therefore clinically relevant. Incorporation of p27^{kip1} into existing prognostic systems would help to further distinguish between a group of patients who are unlikely to progress from those who will require treatment. There was no correlation between the percentage of early apoptotic leukemic lymphocytes and the intracellular content of p27^{kip1}, which may be due to the small size of the study group.

Conclusions. The content of p27^{kip1} protein in leukemic cells adversely affects the clinical course of CLL, increasing the risk of disease progression and shortening the progression-free survival time. The incidence of CD19⁺/glyA⁻/CMXRos⁻ early apoptotic leukemic cells is neither related to the intracellular content of p27^{kip1} protein, nor to selected clinical and laboratory parameters, and it does not influence the disease progression or progression-free survival. Among the examined classical prognostic factors of the CLL course (B2-M and LDH levels, ZAP-70, CD69 and CD71 expression on leukemic cells), only ZAP-70 expression and high LDH serum concentration increased the risk of CLL progression and shortened the disease progression-free survival.