

Прогностички значај нових биолошких маркера у хроничној лимфоцитној леукемији

Данијела Лековић, Биљана Михаљевић, Нада Крагуљац-Куртовић,
Маја Перуничкић-Јовановић, Андрија Богдановић, Милица Чоловић, Мирјана Готић

Клиника за хематологију, Клинички центар Србије, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је болест променљивог клиничког тока и исхода. Код неких болесника она је „стабилна“ и нема потребе за лечењем, док код других брзо напредује и захтева примену терапије одмах након постављања дијагнозе. У скорије време два нова биолошка маркера, експресија *CD38* антигена и *ZAP-70*, показала су се значајним у предвиђању прогнозе код особа оболелих од ХЛЛ.

Циљ рада Циљ студије био је да се испита клинички значај експресије *CD38* антигена и *ZAP-70* у прогнози здравственог стања болесника са ХЛЛ и утврди њихова корелација са другим прогностичким показатељима овог обољења.

Методе рада Испитивање експресије *CD38* антигена урађено је методом имунофенотипизације на узорцима периферне крви, а испитивање експресије *ZAP-70* методом имунохистохемије на формалин-фиксираним биоптатима коштане сржи код 40 новодијагностикованих болесника са ХЛЛ. Прогресија болести је дефинисана периодом од постављања дијагнозе до примене почетне терапије (енгл. *time to first treatment – TFT*).

Резултати Степен експресије *CD38* антигена корелирао је позитивно са експресијом *ZAP-70* ($r=0,476$; $p=0,002$). Позитивна експресија оба наведена параметра статистички је значајно корелирала са неповољним класичним параметрима прогнозе, као што су *C* стадијум болести према Бинеу (*Binet*), дифузна инфилтрација коштане сржи, повишене вредности лактат-дехидрогеназе и β_2 микроглобулина у серуму и време удвостручавања броја лимфоцита краће од 12 месеци. Код болесника с позитивном експресијом *CD38* антигена и *ZAP-70* *TFT* је било краће (\log *rank*: 0,003 према 0,049).

Закључак Оба нова биолошка маркера имају изузетан значај у предвиђању прогнозе болесника са ХЛЛ.

Кључне речи: хронична лимфоцитна леукемија; *CD38* антиген; *ZAP-70*; прогноза

УВОД

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је најчешћи облик леукемије код становништва западних земаља, а чини 24% свих леукемија. То је болест старијег животног доба, будући да је више од 75% болесника старије од 60 година. Болест се, међутим, последњих година све чешће дијагностикује међу млађом популацијом, старом око 35 година. ХЛЛ је болест променљивог клиничког тока и исхода. Код неких болесника она брзо напредује, те се захтева примена терапије одмах након постављања дијагнозе, док је код других болест „стабилна“ и нема потребе за лечењем [1].

До краја двадесетог века за одређивање прогнозе болести коришћене су клиничке класификације према Раију (*Rai*) [2] и Бинеу (*Binet*) [3], које су се заснивале на релативно једноставним клиничким и биолошким параметрима. Ове класификације се и даље примењују и пружају значајне прогностичке информације за високоризичне болеснике са ХЛЛ, али ниједна не омогућава предвиђање тока болести код нискоризичних и болесника у раним стадијумима болести [4, 5]. Поред клиничких класификација, постоје и други класични параметри прогнозе, као што су патохистолошки тип инфилтрације

коштане сржи, време удвостручавања броја лимфоцита, вредност лактат-дехидрогеназе (*LDH*) у серуму и вредност β_2 микроглобулина (β_2M) у серуму. Предвиђање тока болести је важно с обзиром на запажања и ставове да примена почетне терапије одмах након постављања дијагнозе код болесника у раном стадијуму са „прогностичким параметрима скоре прогресије“ може бити значајна за квалитет живота и укупно преживљавање оболелих [6].

Поред класичних прогностичких параметара, данас се препоручује разматрање нових параметара прогнозе, као што су *IgV_H* мутациони статус, експресија *CD38* антигена и експресија *70 kD* зета-асоциране протеин киназе (енгл. *zeta-chain associated protein kinase – ZAP-70*). Велики напредак у прогнози болесника са ХЛЛ постигнут је откривањем *IgV_H* мутационог статуса, на основу којег је могуће разликовати две групе болесника. Болеснике с немутираним *IgV_H* статусом одликују агресиван клинички ток болести и неповољне цитогенетске аномалије, за разлику од болесника с мутираним *IgV_H* статусом [7, 8].

С обзиром на немогућност анализирања *IgV_H* мутационог статуса у рутинској пракси, последњих година откривени су сурогат

Correspondence to:

Danijela LEKOVIĆ
Klinika za hematologiju
Klinički centar Srbije
Dr Koste Todorovića 2
11000 Beograd
Srbija
drlekovic@yahoo.com

маркери на основу којих је могуће предвидети IgV_H мутациони статус, као што су експресија $CD38$ антигена и експресија $ZAP-70$. Ови нови биолошки маркери показали су велики значај као предиктори прогнозе особа оболелих од ХЛЛ [9].

ЦИЉ РАДА

Циљ рада био је да се код болесника са ХЛЛ утврде клинички значај и међусобна повезаност експресије $CD38$ антигена и експресије $ZAP-70$, као нових биолошких маркера прогнозе ХЛЛ, процени повезаност класичних и нових маркера прогнозе и утврди прогностички значај експресије $ZAP-70$ код болесника у раном клиничком стадијуму обољења.

МЕТОДЕ РАДА

Испитаници

Испитано је 40 болесника који су лечени на Клиници за хематологију Клиничког центра Србије у Београду од септембра 2006. до августа 2007. године. Дијагноза ХЛЛ је код свих болесника постављена на основу општеприхваћених критеријума *NCI-WG* и *IWCLL* [10, 11]. Код свих болесника утврђени су лимфоцитоза већа од $5 \times 10^9/l$ у периферној крви, више од 30% лимфоцита у нормоцелуларној или хиперцелуларној коштаног сржи и типичан имунолошки фенотип лимфоцита периферне крви (скор 4-5, према класификацији Светске здравствене организације из 2001. године). У тренутку постављања дијагнозе анализирани су следећи прогностички параметри: старост и пол испитаника, клинички стадијуми болести према Раију и Бинеу, патохистолошки тип лимфоцитне инфилтрације коштаног сржи, време удвостручавања броја лимфоцита (енгл. *lymphocyte doubling time* – *LDT*), вредност *LDH* у серуму, вредност $\beta 2M$ у серуму и експресије $CD38$ антигена и $ZAP-70$.

Код 16 болесника је током извођења студије примењено лечење једним од два најчешће коришћена терапијска модалитета ХЛЛ: хлорамбуцилом или комбинацијом флударабина и циклофосфамида у оквиру терапијског протокола *FC*. Пет болесника је лечено хлорамбуцилом (леукераном), док је код 11 болесника примењено лечење према *FC* протоколу. Остала 24 болесника нису примала ниједну хемиотерапију од тренутка постављања дијагнозе до августа 2007. године.

Методологија испитивања

Биоптати коштаног сржи су фиксирани у десетопроцентном неутралном формалину 24-36 часова, потом декалцификовани у *EDTA* пуферу три часа и калупљени у парафину. За морфолошку анализу коришћени су пресеци ткива дебљине $4 \mu m$ који су прво депарафи-

нисани и обојени гимзом (*Giemsa*). Инфилтрација коштаног сржи је према степену категоризована на три типа: нодуларна, нодуларно-интерстицијална и дифузна.

За имунохистохемијску анализу коришћени су пресеци ткива дебљине $4-5 \mu m$ који су монтирани на специјалне адхерентне плочице (*SuperFrost Plus*, *Menzel-Glaser, Deutschland*) и сушени на температури од $56^\circ C$ један сат. Анализа експресије $ZAP-70$ вршена је применом козјег поликлонског антихуманог антитела (*Santa Cruz Biotechnology, California, USA*) и високосензитивне и специфично обележене стрептавидин-биотин комплексне имунохистохемијске методе (*LSAB⁺/HRP*), у којој је стрептавидин обележен пероксидазом рена, а као хромоген је коришћен 3,3'-диамино-бензидин (*DAB*). Препарати су анализирани помоћу стандардног светлосног микроскопа, најпре под увећањем од 100 пута, а након препознавања репрезентативних поља, избројане су позитивно обојене ћелије при увећању од 400 пута. Анализиране су искључиво Б-ћелије с јасном цитоплазматском експресијом $ZAP-70$, чија је учесталост изражавана у процентима [12].

Имунофенотипска анализа експресије $CD38$ антигена на леукемијским лимфоцитима периферне крви урађена је применом методе директне имунофлуоресценције на проточном цитометру.

Статистичка обрада података

За анализирање података коришћене су аналитичке и дескриптивне статистичке методе, а сви подаци приказани су графички. *TFT* представља време од постављања дијагнозе до примене првог лечења. *TFT* је анализиран коришћењем Каплан-Мајерове (*Kaplan-Meier*) методе. За оцену значајности разлике појединачних прогностичких параметара између различитих група болесника са ХЛЛ коришћена је једнофакторска анализа варијансе *ANOVA*. На основу мера централне тенденције (средње вредности, стандардне девијације, стандардне грешке и медијане) и резултата публикованих радова, за меру позитивности $ZAP-70$ узета је вредност од 20%, а за позитивност $CD38$ антигена вредност од 30%. Статистичка обрада података урађена је у статистичком софтверу *SPSS* верзија 12.

РЕЗУЛТАТИ

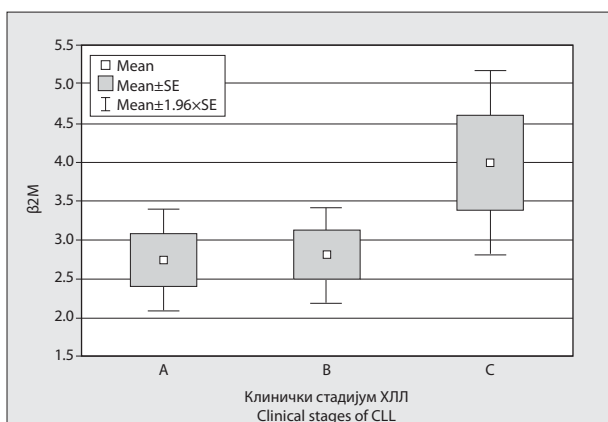
Истраживање је обухватило 40 болесника (26 мушкараца и 14 жена) који су у просеку били стари 68 година. Расподела болесника према класификацији Бинеа била је следећа: у стадијуму А било је 19 болесника (47,5%), у стадијуму В 15 болесника (37,5%), а у стадијуму С шест болесника (15%). Патохистолошком анализом биоптата коштаног сржи код 10 болесника (25%) утврђена је нодуларна инфилтрација коштаног сржи, код 21 болесника (52,5%) нодуларно-интерстицијална инфилтрација, а код девет болесника (22,5%) дифузна инфилтрација.

Класични прогностички параметри

Анализом расподеле различитих класичних параметара прогнозе према стадијумима обољења Бинеове класификације доказано је да су болесници у С клиничком стадијуму болести имали статистички значајно више вредности LDH ($p=0,0001$) и β_2M ($p=0,048$) (Графикон 1), у односу на болеснике у А клиничком стадијуму болести. Такође, болесници у С клиничком стадијуму имали су LDT краће од 12 месеци у односу на болеснике у А клиничком стадијуму болести ($p=0,03$) (Графикон 2). Анализом дистрибуције β_2M према типу инфилтрације коштане сржи показано је да су болесници са дифузним типом инфилтрације имали статистички значајно више вредности β_2M него болесници са нодуларним типом ($p=0,0001$) (Графикон 3).

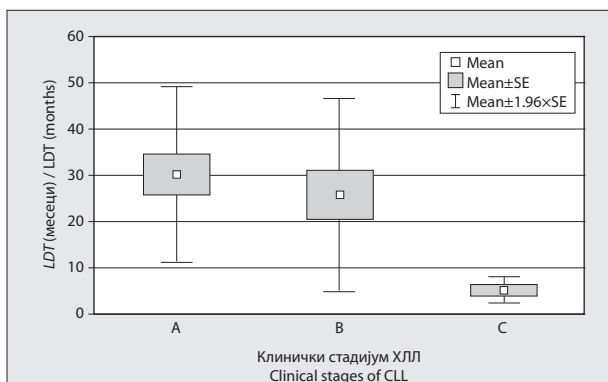
Експресија $CD38$ антигена

Код трећине болесника утврђена је позитивна експресија $CD38$ антигена ($\geq 30\%$), док су остале две трећине болесника имале негативну експресију $CD38$ антигена ($< 30\%$). Поређењем класичних параметара прогнозе и



Графикон 1. Једнофакторска анализа варијансе вредности β_2M у односу на клиничке стадијуме хроничне лимфоцитне леукемије (ХЛЛ) према класификацији Бинеа

Graph 1. One-way ANOVA analyses of β_2M variance level according to Binet clinical stages of chronic lymphocytic leukaemia (CLL)



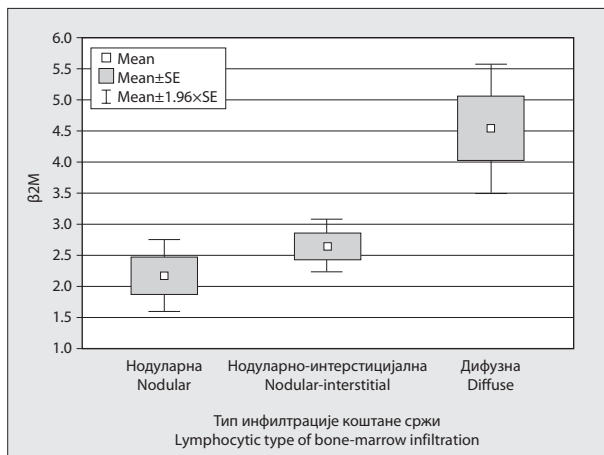
Графикон 2. Једнофакторска анализа варијансе времена удвостручавања броја лимфоцита (LDT) у односу на клиничке стадијуме ХЛЛ према класификацији Бинеа

Graph 2. One-way ANOVA variance analyses of lymphocyte doubling time (LDT) according to Binet clinical stages of CLL

експресије $CD38$ антигена доказана је статистички значајно већа експресија овог антигена код болесника са дифузном инфилтрацијом коштане сржи ($p=0,004$) и болесника са LDT краћим од 12 месеци ($p=0,02$). Анализом TFT у зависности од експресије $CD38$ антигена утврђено је да је код болесника са позитивном експресијом $CD38$ антигена био статистички значајно краћи период прогресије болести него код болесника са негативном експресијом овог антигена ($\log rank, p=0,003$) (Графикон 4).

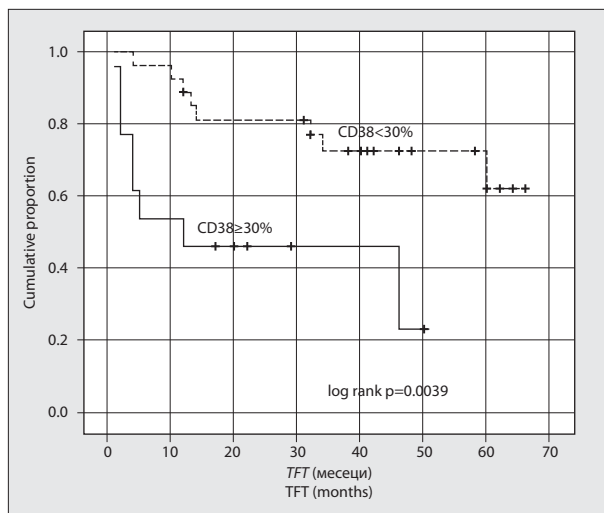
Експресија $ZAP-70$

Резултати анализе експресије $ZAP-70$ су указали на негативну експресију ($\leq 20\%$) код 10 болесника (25%), а позитивну експресију ($> 20\%$) код 30 (75%). Поређењем експресије $CD38$ антигена и експресије $ZAP-70$ доказана је значајна корелација скоро линеарног типа (Пирсонов тест корелације, $r=0,476$; $p=0,002$) (Графикон 5).



Графикон 3. Једнофакторска анализа варијансе вредности β_2M у односу на тип лимфоцитне инфилтрације коштане сржи

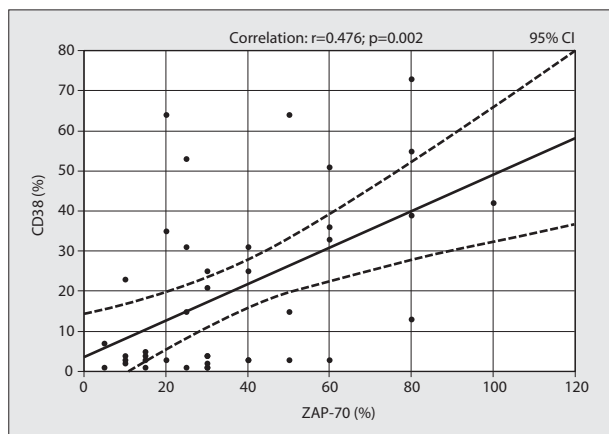
Graph 3. One-way ANOVA analyses of β_2M variance level according to lymphocytic type of bone-marrow infiltration



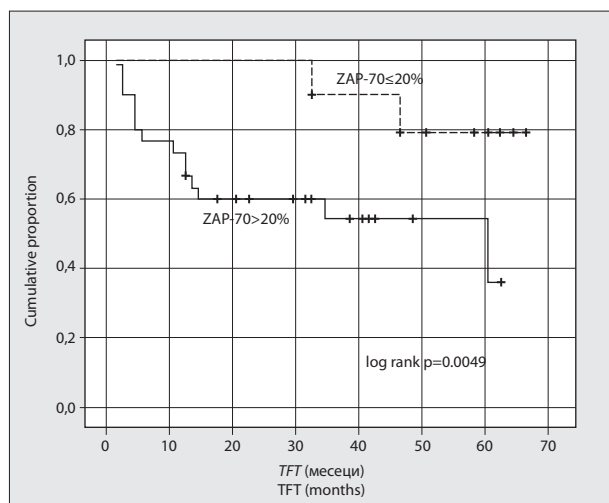
Графикон 4. Време од дијагнозе до терапије (TFT) у зависности од експресије $CD38$ антигена

Graph 4. Time to first treatment (TFT) according to the expression of $CD38$ antigen

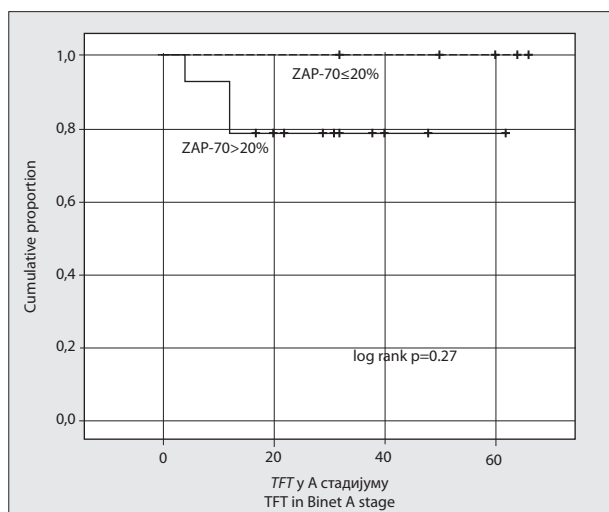
Анализом расподеле класичних параметара прогнозе и експресије *ZAP-70* показана је статистички значајно већа експресија *ZAP-70* код болесника са дифузним



Графикон 5. Пирсонова корелација експресије *CD38* антигена и *ZAP-70*
Graph 5. Pearson correlation between expression of *CD38* antigen and *ZAP-70*



Графикон 6. *TFT* у зависности од експресије *ZAP-70*
Graph 6. *TFT* according to the expression of *ZAP-70*



Графикон 7. *TFT* у зависности од експресије *ZAP-70* у А стадијуму према класификацији Бинеа
Graph 7. *TFT* according to *ZAP-70* expression in A stage by Binet

типом инфилтрације коштане сржи ($p=0,014$), код болесника у С клиничком стадијуму обољења ($p=0,018$) и код болесника са *LDT* краћим од 12 месеци ($p=0,0001$). Анализом *TFT* у зависности од експресије *ZAP-70* показано је да је код болесника с позитивном експресијом био статистички значајно краћи период до прогресије болести него код болесника с негативном експресијом *ZAP-70* (*log rank*, $p=0,049$) (Графикон 6). Анализом *TFT* у зависности од експресије *ZAP-70* у А стадијуму обољења показано је да су болесници с позитивном експресијом имали краћи период до прогресије болести, али разлика није била статистички значајна (Графикон 7).

ДИСКУСИЈА

ХЛЛ је биолошки хетерогена болест. Код више од 80% болесника ХЛЛ се дијагностикује у почетном клиничком стадијуму. Унутар сваког клиничког стадијума болесници могу имати различиту прогнозу. Одређивање прогнозе болести је веома значајно за одлуку о лечењу. Класификације Бинеа и Раија су први испитивани класични параметри прогнозе на основу којих се процењује величина туморске масе [3, 4], али не и агресивност болести. У овој студији је показано да се 85% болесника са ХЛЛ у тренутку постављања дијагнозе налази у А клиничком стадијуму према Бинеу. Анализом група болесника према стадијумима Бинеове класификације доказана је корелација појединих класичних параметара прогнозе. Код болесника у узнапредовалим стадијумима болести (С) *LDT* је било краће од годину дана, док су вредности *LDH* и β_2M биле повишене. Ови болесници припадају групи болесника с високим ризиком прогресије болести.

Хан (*Han*) и сарадници [14] су у своме раду испитивали прогностички значај типа инфилтрације коштане сржи код болесника са ХЛЛ. Ови аутори су запазили да постоје две прогностички различите групе болесника са ХЛЛ. Прву прогностички повољну групу чинили су болесници са недифузним типом инфилтрације (нодуларни, нодуларно-интерстицијални), који се углавном налазе у раном стадијуму болести, док су другу прогностички неповољну групу чинили болесници са дифузним типом инфилтрације и узнапредовалим стадијумом болести. Резултати нашег истраживања у складу су с налазима ових аутора.

Имајући у виду значај процене предвиђања тока болести, данас се, поред већ добро познатих класичних маркера, препоручује анализирање и нових биолошких маркера [13]. Нови маркери прогнозе ХЛЛ су веома значајни за идентификацију болесника с високим ризиком прогресије у раним стадијумима болести. Први значајан напредак било је откриће прогностичког значаја *IgV_H* мутација, тј. соматских хипермутација у домену гена за варијабилни регион тешких ланаца имуноглобулина. С обзиром на то да проучавање *IgV_H* мутација у рутинској пракси није могуће због неопредељености лабораторија молекуларнобиолошким тех-

никама, скупоће и дуготрајности самог поступка, открити су сурогат маркери, експресија *CD38* антигена и *ZAP-70* [18, 19].

Дамле (*Damle*) и сарадници [8] су у својој студији први показали повезаност *IgV_H* мутационог статуса и експресије *CD38* антигена и њихов значај за прогнозу и преживљавање болесника са ХЛЛ. Према овој студији, постоје две прогностички различите групе болесника. Прогностички добру групу чинили су болесници с негативном експресијом *CD38* антигена и мутираним *IgV_H* статусом, док су неповољну чинили болесници с позитивном експресијом *CD38* антигена и немутираним *IgV_H* статусом. Резултати нашег истраживања су показали да је степен експресије *CD38* антигена независна прогностичка варијабла са статистичком значајношћу и могућношћу дискриминације између прогностичких група. Болесници са ХЛЛ који су имали негативну експресију *CD38* антигена припадају групи болесника с малим ризиком прогресије болести и имају велике могућности за индолентни ток болести, за разлику од болесника с позитивном експресијом *CD38* антигена, који припадају групи са високим ризиком прогресије обољења и код којих је ток болести углавном агресиван. Међутим, поједини аутори су у својим радовима запазили да корелација између експресије *CD38* антигена и *IgV_H* мутација није апсолутна, будући да експресија *CD38* антигена може да се мења током прогресије болести, а да мутациони статус при том остаје непромењен [5].

Последњих година многи аутори истичу значај експресије *ZAP-70* као новог независног прогностичког параметра за ХЛЛ и као сурогат маркера за *IgV_H* мутациони статус [9, 20]. Вистнер (*Wiestner*) и сарадници [21] су анализирајући групу од 107 испитаника с ХЛЛ запазили да се на основу експресије *ZAP-70* предвиђа *IgV_H* мутациони статус код 93% болесника са ХЛЛ. Кребер (*Kröber*) и сарадници [22] су запазили да се одступања од овог правила јављају као последица додатних високоризичних биолошких маркера, као што су експресија *del(17p)*, *del(11q)* или *V3-21*. Гибс (*Gibbs*) и сарадници [23] су анализирајући испитанике са ХЛЛ установили да је експресија *ZAP-70* стабилна током болести. Наше испитивање од тренутка постављања

дијагнозе до започињања лечења према степену експресије *ZAP-70* у А клиничком стадијуму према Бинеу указало је на постојање две групе болесника с различитим ризиком прогресије болести, али разлика није била статистички значајна с обзиром на мали број анализираних болесника (19 болесника). Овај налаз потврђује запажања Занотија (*Zanotti*) и сарадника [24] о двема групама болесника с различитим ризиком прогресије болести према експресији *ZAP-70* без обзира на клинички стадијум обољења. Наши резултати корелације експресије *ZAP-70* и класичних маркера прогнозе доказали су статистички значајну корелацију позитивне експресије *ZAP-70* с неповољним класичним прогностичким маркерима, као што су дифузна инфилтрација коштане сржи, повишене вредности β_2M и *LDT* краће од 12 месеци. Овај налаз у складу је са запажањима Занотија и сарадника [24] и Кима (*Kim*) и сарадника [25] о начину корелације експресије *ZAP-70* с класичним маркерима прогнозе и њиховом утицају на прогнозу код болесника са ХЛЛ.

ЗАКЉУЧАК

Резултати нашег испитивања доказали су значај експресије *CD38* антигена и експресије *ZAP-70* у прогнози стања болесника са ХЛЛ, тако да је код оних с позитивном експресијом оба нова маркера напредовање болести брже. Болесници с позитивном експресијом *ZAP-70* имају већи ризик од прогресије болести чак и у раним стадијумима обољења.

Потврђена је корелација експресије *CD38* антигена и експресије *ZAP-70* са класичним прогностичким маркерима, која омогућава издвајање групе болесника с високим ризиком прогресије болести. Болесници с позитивном експресијом оба нова маркера (експресија *CD38* антигена $\geq 30\%$, експресија *ZAP-70* $> 20\%$) припадају групи болесника с класичним маркерима лоше прогнозе (С стадијум према Бинеовој класификацији, *LDT* краће од 12 месеци, дифузна инфилтрација коштане сржи, вредност β_2M већа од 1,8 mg/l, вредност *LDH* већа од 320 IU/l) и имају висок ризик за прогресију болести.

ЛИТЕРАТУРА

- Dighiero G. CLL biology and prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005; 278-84.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975; 46:219-34.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piquet H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48:198-206.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J*. 2000; 343:1910-6.
- Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*. 2005; 90:391-9.
- Montserrat E. Current and developing chemotherapy for CLL. *Med Oncol*. 2002; 19:511-19.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94:1848-54.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94:1840-7.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001; 194:1639-47.
- Cheson BC, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996; 87:4990-7.

11. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia: Recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *Ann Intern Med.* 1989; 110:236-8.
12. Miller K. Immunohistochemical techniques. In: Bancroft J, Gamble M. editors. *Theory and Practice of Histological Techniques.* 5th ed. London, UK: Churchill Livingstone; 2002. p.421-64.
13. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100:1410-6.
14. Han T, Barcos M, Emrich L, Ozer H, Gajera R, Gomez GA, et al. Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *J Clin Oncol.* 1984; 2:562-70.
15. Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezio P, Magnac C, Michel A, et al. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2003; 21:3928-32.
16. Tobin G, Rosenquist R. Prognostic usage of V(H) gene mutation status and its surrogates markers and the role of antigen selection in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol.* 2005; 22:217-28.
17. Thorsélius M, Kröber A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Bühler A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood.* 2006; 107:2889-94.
18. Seiler T, Döhner H, Stingelbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncology.* 2006; 33:186-94.
19. Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, Graveland WJ, Valk PJ, Kraan J, et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006; 70:136-41.
20. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348:1764-75.
21. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrikson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* 2003; 101:4944-51.
22. Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seiler T, Kienle D, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2006; 24:3219-20.
23. Gibbs G, Bromidge T, Howe D, Johnson S. ZAP-70 expression remains stable in chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2007; 29:225-7.
24. Zanotti R, Ambrosetti A, Lestani M, Ghia P, Pattaro C, Reno A, et al. ZAP-70 expression, as detected by immunohistochemistry on bone marrow biopsies from early-phase CLL patients, is a strong adverse prognostic factor. *Leukemia.* 2007; 21:102-9.
25. Kim SZ, Chow KU, Kukoc-Zivojnov N, Boehrer S, Brieger A, Steimle-Grauer SA, et al. Expression of ZAP-70 protein correlates with disease stage in chronic lymphocytic leukemia and is associated, but not generally restricted to non-mutated IgVH status. *Leuk Lymphoma.* 2004; 45:2037-45.

Prognostic Significance of New Biological Markers in Chronic Lymphocytic Leukaemia

Danijela Leković, Biljana Mihaljević, Nada Kraguljac-Kurtović, Maja Peruničić-Jovanović, Andrija Bogdanović, Milica Čolović, Mirjana Gotić

Clinic for Haematology, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Chronic lymphocytic leukaemia is a disease with heterogeneous clinical course and outcome. Some patients have a progressive course of the disease and require therapy immediately after the diagnosis, while others have a stable form without the need for treatment. Recently, two new biological markers, the expression of CD38 antigen and ZAP-70 have shown independent significance in the prognosis in CLL patients.

Objective The aim of our study was to evaluate the clinical value of CD38 antigen and ZAP-70 expression as predictors of the disease progression and to analyze the correlation of these markers with other B-CLL prognostic markers.

Methods We assessed the expression of CD38 antigens by flow cytometry on peripheral blood samples and the expression of ZAP-70 by immunohistochemistry on formalin-fixed bone marrow (BM) biopsies in 40 newly diagnosed B-CLL patients. Dis-

ease progression was defined by the period elapsed from diagnosis to the time to first treatment (TFT).

Results Expression of CD38 antigen correlated positively with ZAP-70 expression (Pearson, $r=0.476$; $p=0.002$). Also, correlation analysis results showed that a positive expression of CD38 and ZAP-70 statistically significantly correlated with unfavourable classical prognostic parameters, such as advanced Binet stage C, diffuse BM infiltration, increased lactate-dehydrogenase and beta-2 microglobulin serum levels. Patients with positive expression of CD38 antigen and ZAP-70 had a shorter TFT (log rank, 0.003 vs. 0.049).

Conclusion Both new biological markers were shown to have an exceptional significance in the prediction of prognosis in CLL patients

Keywords: chronic lymphocytic leukaemia; CD38 antigen; ZAP-70; prognosis

Примљен • Received: 05/05/2010

Прихваћен • Accepted: 01/11/2010