

Vlasatobunková leukémia

Ján Lazúr^{1,2}, Martin Mistrík³

¹ *IV.interná klinika, Univerzitná nemocnica L.P., Košice*

² *MEDIREX – laboratórna diagnostika, Košice*

³ *Klinika hematológie a transfuziológie, LF UK a UN, Bratislava*

História

1923, *Ewald*

– leukämische reticuloendoteliose

1958, *Bouroncleová*

- 26 pacientov, klinickopatologická jednotka

1966, *Schrek a Donelly*

– „hairy cell“ (*fázový kontrast*)

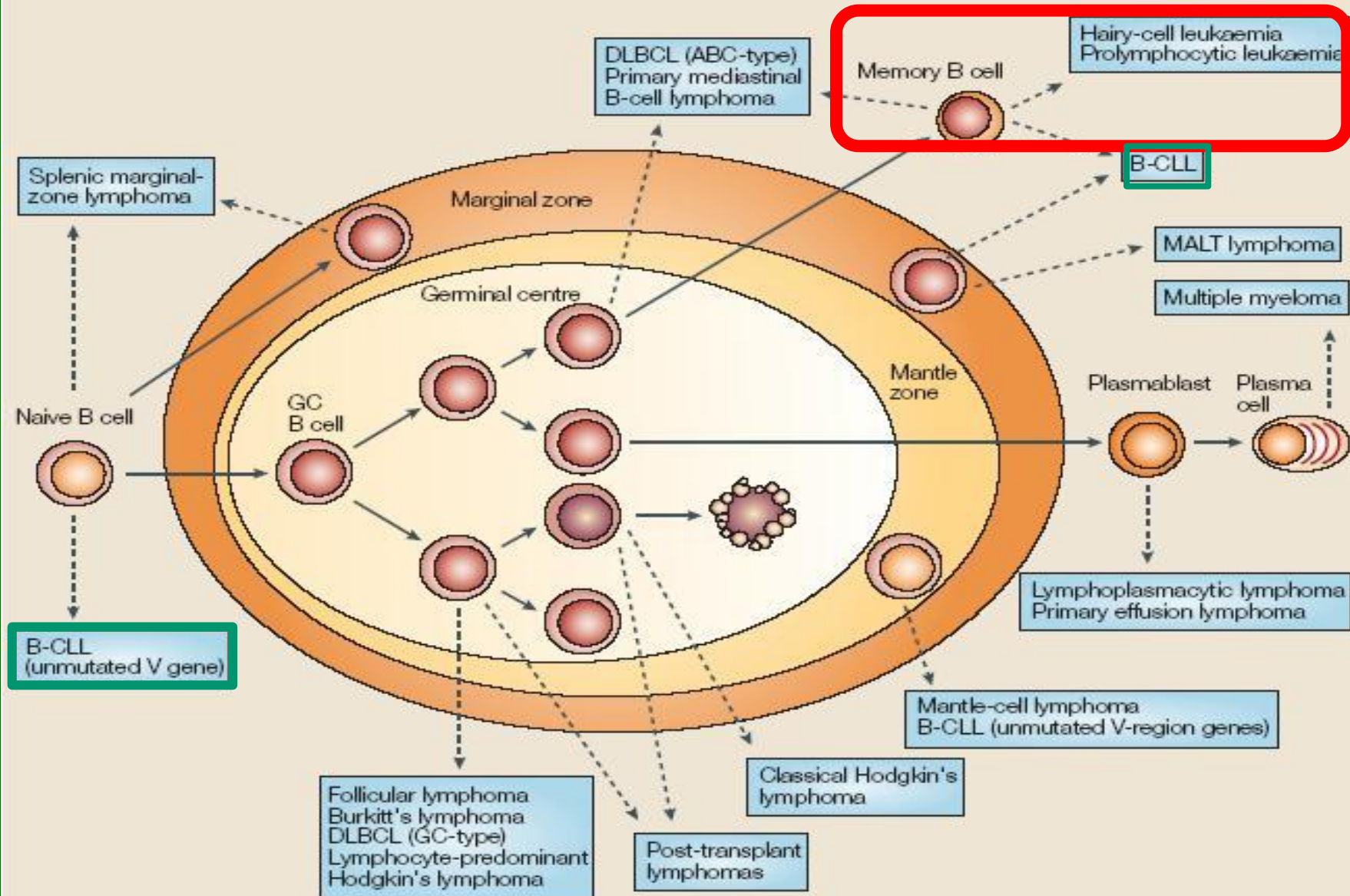
1974, *Catovsky et al, Fu et al, Haak et al*

- B lymfocytový pôvod

Epidemiológia HCL

- ❖ 2% zo všetkých leukémií
- ❖ Incidencia (*v západnej Európe*):
4/ 1 mil /rok u mužov
muži:ženy = 4:1
- ❖ Najčastejšia diagnostika - 5.veková dekáda
- ❖ Možný vplyv: orgánofosfátové pesticídy, herbicídy

Pôvod HCL buniek



Pôvod HCL buniek

- pamäťové B-bunky CD27- *(IgVH mutované?)*
- interfolikulárne B-bunky z marginálnej zóny CD27-
(?) *(IgVH nemutované?)*

Forconi F et al, Haematologica, 2008;93(5):697-705

Knapp, W. et al, Oxford University Press, 1989

Zvláštnosti HC buniek

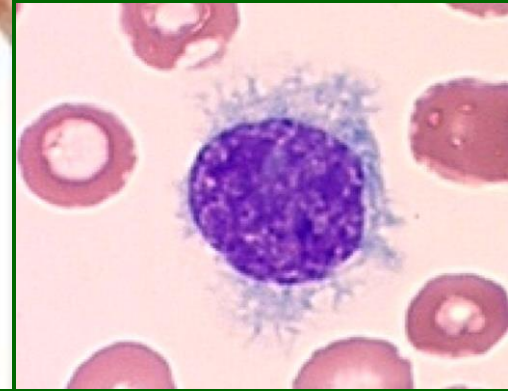
- ❖ Prečo sú vlasaté?
- ❖ Prečo spôsobujú pancytopéniu?
- ❖ Prečo málo cirkulujú v periférnej krvi, osídľujú prednostne dreň a slezinu ?
- ❖ Prečo spôsobujú fibrotizáciu drene?

Odpovede

- ❖ **vlasatosť** (mikroklky membrány) = vysoký obsah F-aktinu
(*Neexistuje normálny morfológický korelát, vlasatosť až po leukemizácii!*)
- ❖ „**homing**“ v slezine a drene = *adherencia integrínu $\alpha_4\beta_1$ k VCAM-1*
- ❖ **pancytopénia** = *tvoria TNF- α , IL-1 β , IL-10*
(+ *hypersplenizmus + infiltrácia drene*)
- ❖ **fibrotizácia drene** = *tvoria rastový faktor fibroblastov, zvýšená tvorba fibronectínu*

Diagnostická triáda HCL

1. splenomegalia
2. pancytopénia
3. cirkulujúce vlasaté bunky



Klinický obraz HCL

- ❖ **splenomegália** (82%)
- ❖ hepatomegália (30%)
- ❖ **prejavy pancytopénie**
 - únava a slabosť (80%)
 - infekcie (20-30%)
 - krvácavé prejavy (20-30%)
- ❖ **bez periférnej lymfadenopatie** (95%)
 - abdominálna a mediastinálna lymfadenopatia - CT (1/3 pt)
- ❖ **iné** – autoimunitné prejavy, postihnutie kože, ruptúra sleziny
- ❖ **bez klinických prejavov** (25%)

Laboratórny nález pri HCL

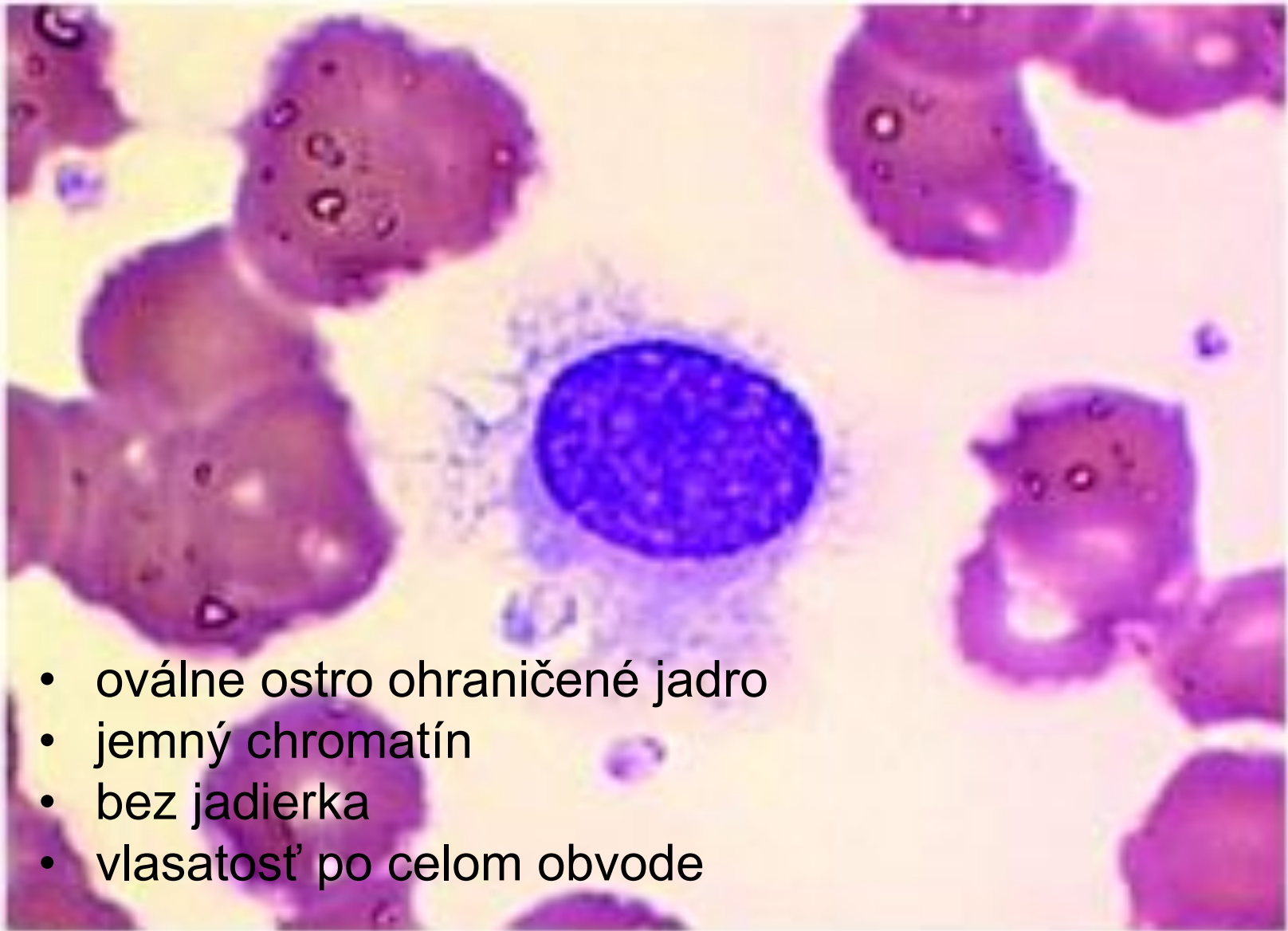
- ❖ leukopénia (80%)
- ❖ neutropénia ($\leq 0,5 \times 10^9/L$) (70%)
- ❖ monocytopenia (90%)
- ❖ anémia (80%)
- ❖ trombocytopenia (80%)

- ❖ leukocytóza (15%)
- ❖ HCs v periférnej krvi (90%) - (*kritérium bez kvantifikácie*)
- ❖ HCs v kostnej dreni (100%)

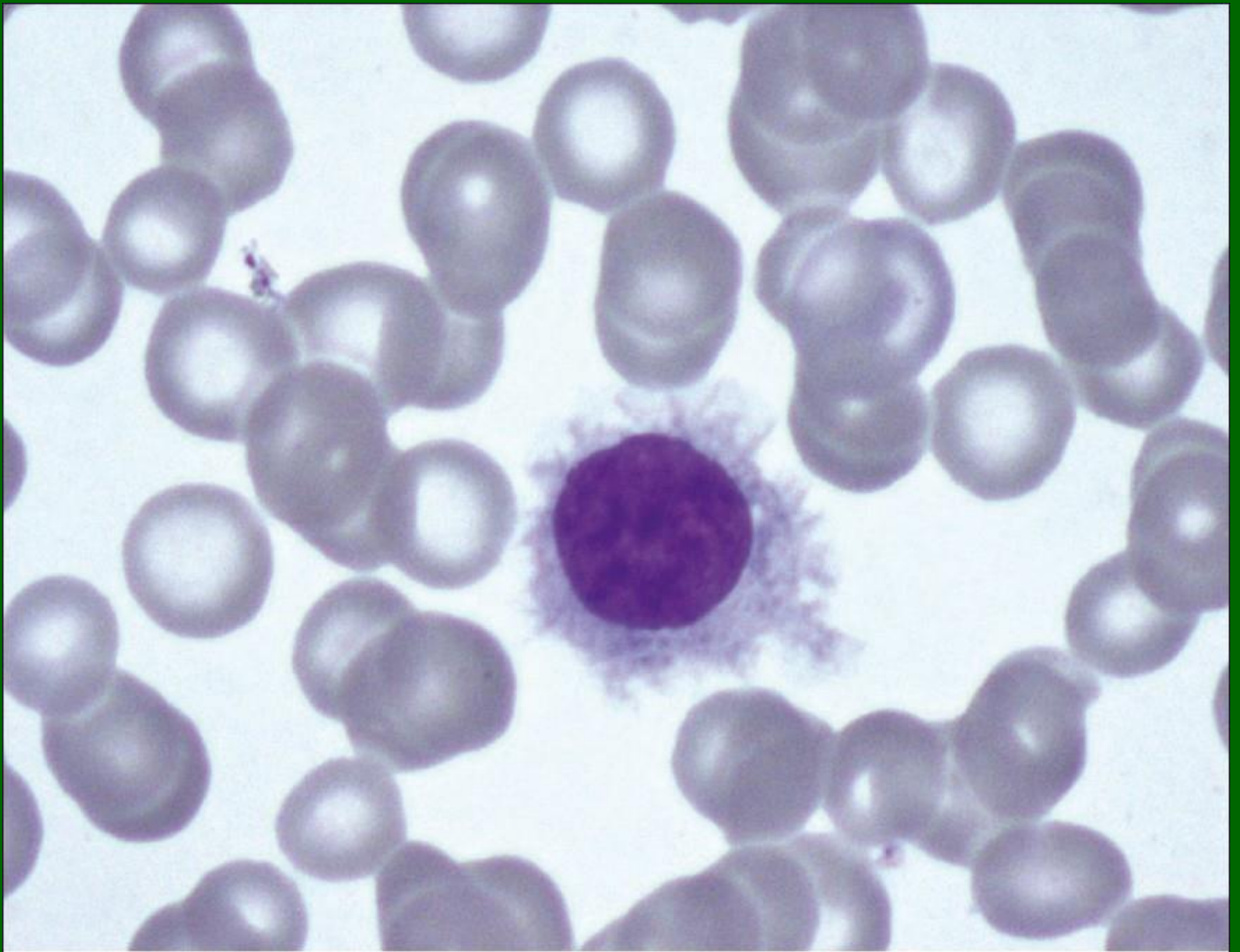
Diagnostika HCL

- ❖ **cytológia**
- ❖ **cytochémia**
- ❖ **imunofenotypizácia**
- ❖ **histológia drene**
- ❖ **molekulová genetika**

Cytológia



- oválne ostro ohraničené jadro
- jemný chromatín
- bez jadierka
- vlasatosť po celom obvode



Cytochémia - kyslá fosfatáza (TRAP)



Imunofenotypizácia HCs

CD19+, CD20+, **CD22++** (*pan B-Ly*)

CD11c+ (*primárne myelomonocytové bunky*)

CD25+ (*receptor pre IL-2*)

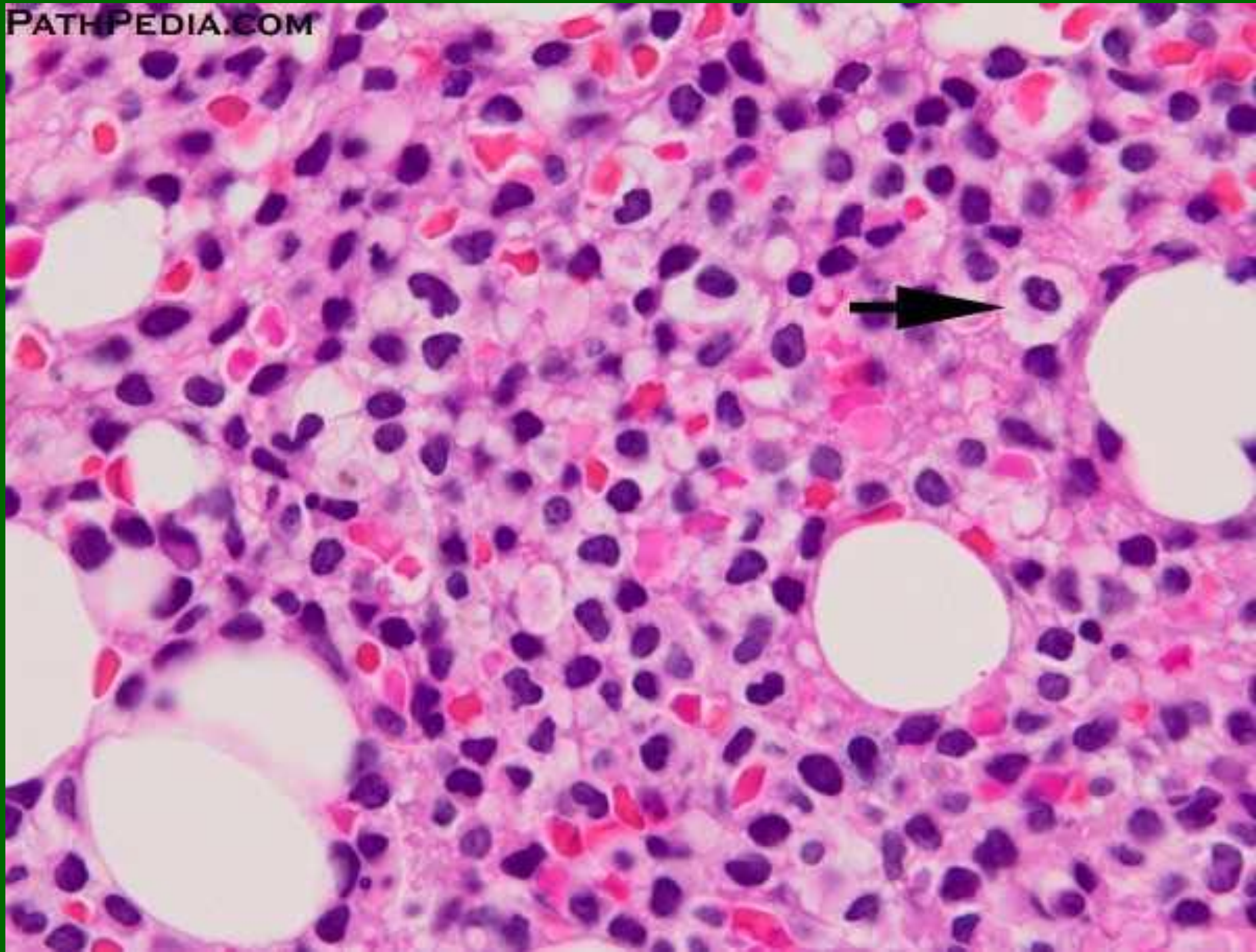
CD103+ (*β_7 integrin*)

CD123+ (*receptor pre IL-3*)

CD5-, CD23-, CD79b-

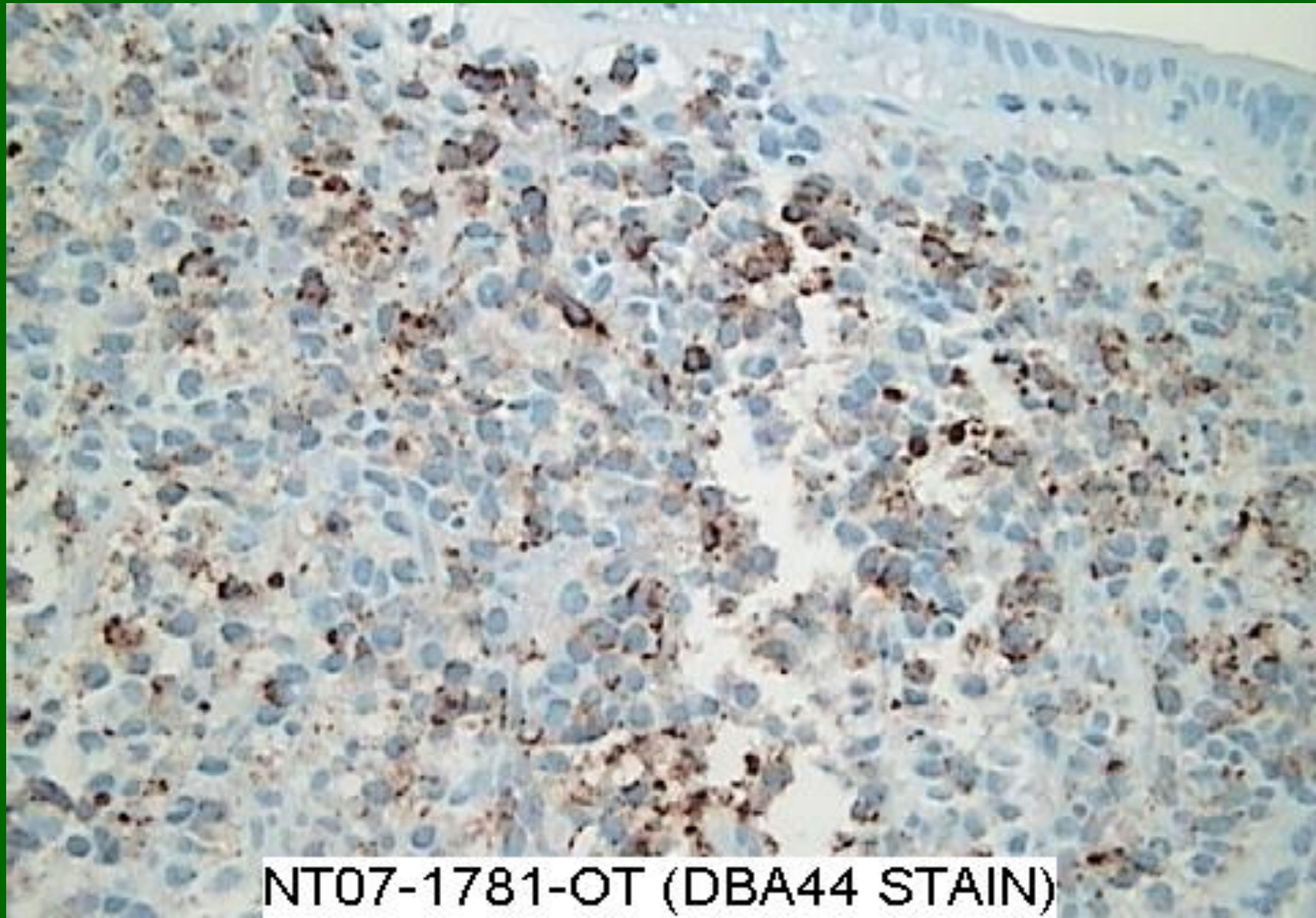
Histológia („volské oká“)

PATHPEDIA.COM



Imunohistochemia – DBA44

(ANXA1)



NT07-1781-OT (DBA44 STAIN)

Molekulová diagnostika

Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al.

BRAF mutations in hairy-cell leukemia

N Engl J Med. **2011**;364(24):2305-2315

BRAF

- ❖ ľudský gén (*protoonkogén **B-Raf***)
- ❖ produkt génu = serín-threonínová kináza **B-Raf**
- ❖ RAF kináza je súčasťou signálnej kinázovej kaskády **RAS-RAF-MEK-ERK** a **MAPK**, regulujúcej bunkové prežívanie, proliferáciu a diferenciáciu

RAF (*rapidly accelerated fibroblast kinase*)

MEK (*MAPK/extracellular-signal-regulated kinase*)

ERK (*extracellular signal regulated kinase*)

MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)

Mutovaná kináza BRAF aberantne aktivuje MEK-ERK, čím podporuje proliferáciu a tlmí apoptózu.

Výskyt mutácie BRAF V600E

R.2002 – popis prvých mutácií BRAF

najčastejšie V600E (*substitúcia valínu kys. glutamovou*)

Výskyt: melanom (50%)

Langerhansova histiocytóza (50%)

papilárny ca thyroidey...(40%)

kolorektálny ca (11%)

BRAF mutácia nie je špecificky kauzálna!

cHCL(~100%)

BRAF mutácia sa nevyskytuje v žiadnej inej B-lymfoproliferácii.

Pri HCL má kauzálny etiopatogenetický význam!

Význam mutačného stavu IgVH génov

Mutačný stav IgHV génov rozlišuje, či sa B-Ly stretol s antigénom v germinatívnom centre, alebo či pochádza z antigénne naivných B.

Pri HCL sú najčastejšie zisťované expresie génov:

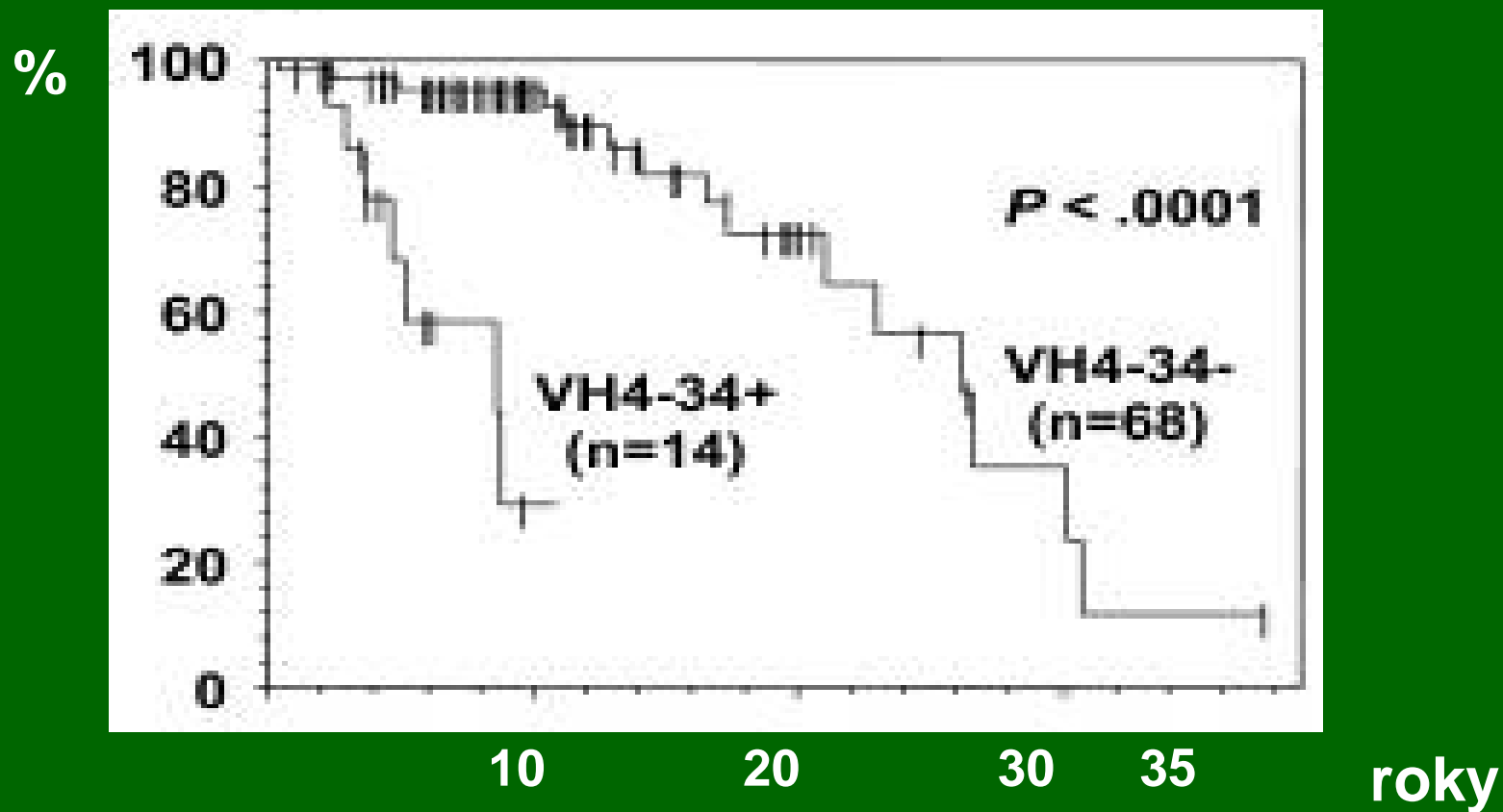
IgVH3-21, IgVH3-30, IgVH3-33, IgVH4-34

Expresia génov skupiny IgVH4-34 je pri HCL vždy v nemutovanom stave.

VH4-34 pozitívna HCL:

- refraktérnosť na liečbu, zlá prognóza
- BRAF V600E - negat.
- MAP2K1 - pozit. (nižší stupeň kaskády
RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK)

Prežívánie HCL pacientov - s expresiou vs. bez expresie génu VH4-34



Arons E et al, Blood, 2009; 114(21):4689-4695

WHO klasifikácia 2016

Mature B-cell neoplasms

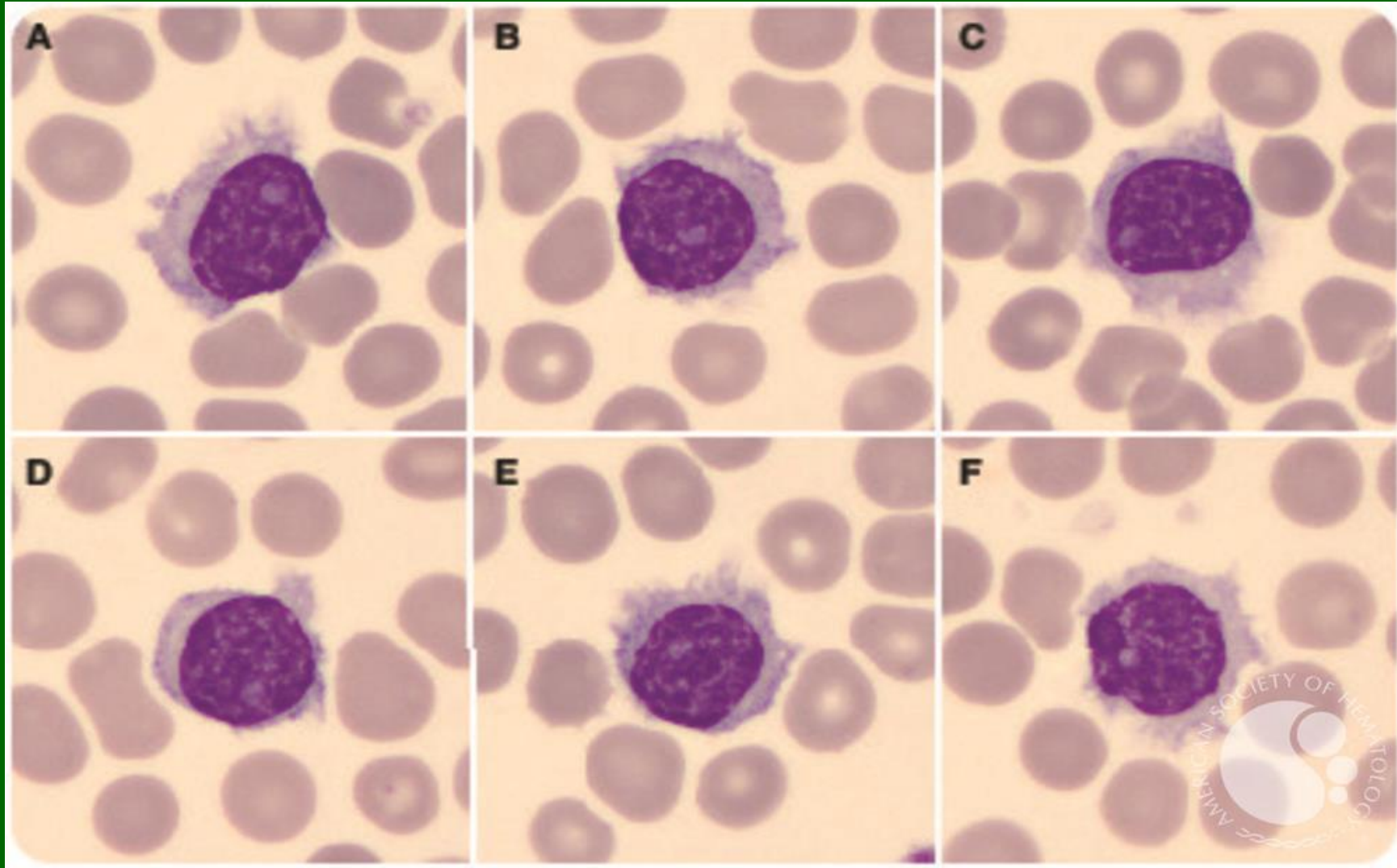
- ❖ Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
- ❖ Monoclonal B-cell lymphocytosis*
- ❖ B-cell prolymphocytic leukemia
- ❖ Splenic marginal zone lymphoma (splenický lymfóm s vilóznymi L_y)
- ❖ **Hairy cell leukemia**
- ❖ Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable
 - Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma*
 - Hairy cell leukemia-variant***
- ❖ Lymphoplasmacytic lymphoma
 - Waldenstrom macroglobulinaemia
- ❖ ”
- ❖ ”
- ❖ ”

Diferenciálna diagnostika HCL a HCL-like

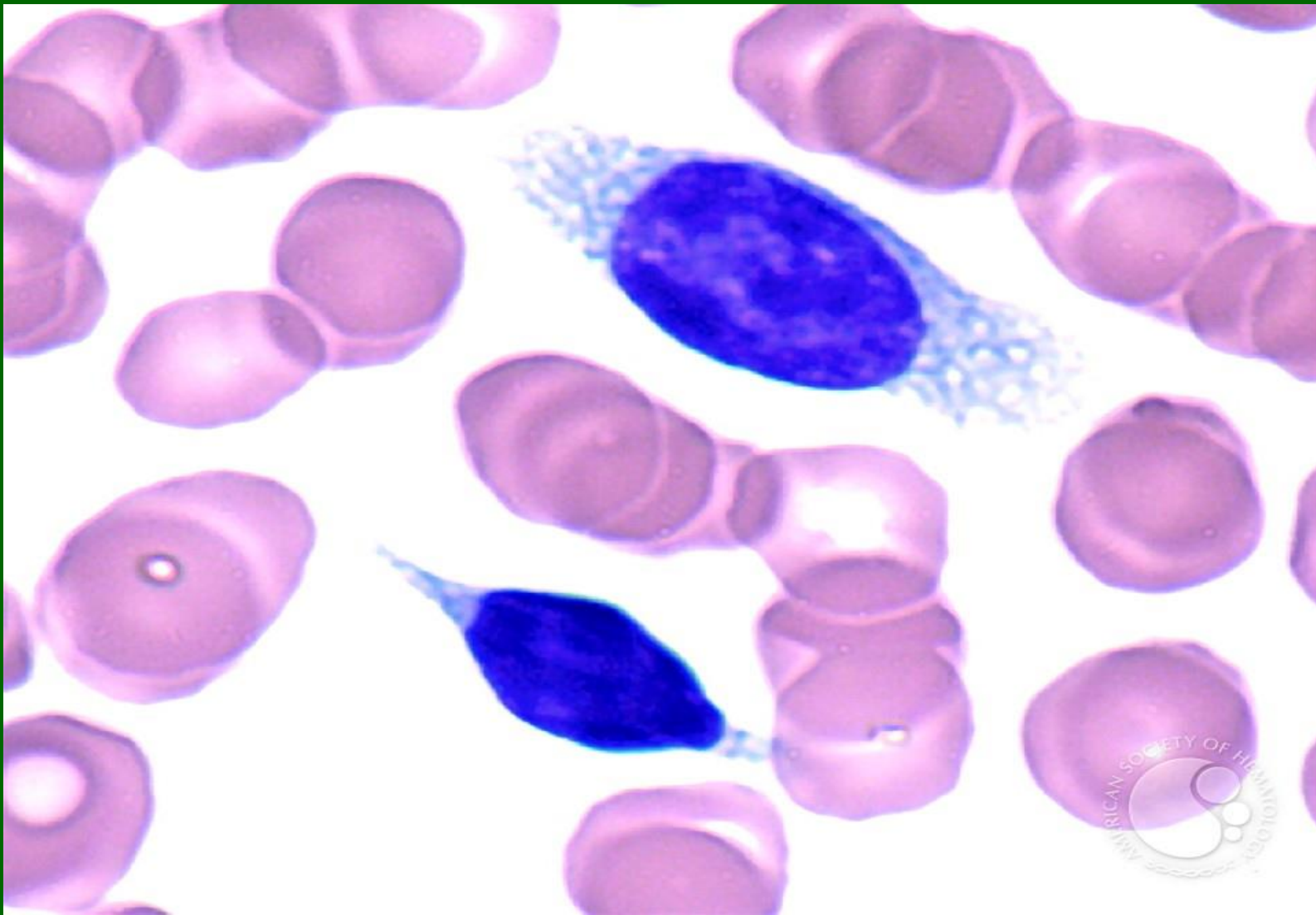
	CD11c	CD25	CD103	CD123
HCL	+	+	+	+
vHCL	+	-	+	-
SMZL SLVL	+/-	-/+	-/+	-
SDRPBCL	+	-	-/+	-

SDRPBCL = splenic diffuse red pulp B-cell lymphoma

Bunky variantnej HCL



Splenický lymfóm s vilóznymi Ly (SLMZ)



HCL variant (Cawley, 1980)

- ❖ leukocytóza ($>100,0 \times 10^9/L$), bez monocytopenie, TRAP negat
splenomegalia \pm , vyšší vek
 - ❖ morfológia: jadro ako prolymfocyt, cytoplazma ako HCs
 - ❖ imunofenotypizácia: CD11c+, **CD25-**, CD103+/-, CD123-
 - ❖ aspirácia kostnej drene hypercelulárna (*bez fibrózy*)
-
- ❖ molekulová genetika: BRAF V600E - negat.,
MAP2K1 – pozit. (50%)

Liečba HCL

Indikácia

- cytopénia: **Hb**<110 g/l, **Neu**<1,0x10⁹/l, **Tr**<100x10⁹/l
- symptomatická splenomegalia
- celkové príznaky: recidivujúce infekty, hemoragické prejavy

10% pacientov nevyžaduje vôbec liečbu.

Efekt liečby: KR – bez symptómov a organomegalie

Hb≥120 g/l, Neu≥1,5x10⁹/l, Tr≥100x10⁹/l

PR - v dreni pokles HCs o 50%

periféria<5% HCs, ostatné ako KR

Význam minimálnej reziduálnej choroby

MRD = infiltrácia zistená len imunohistochemickým farbením (DBA44, anti-CD20, VE1), nie konvenčným farbením.

Skupiny podľa rizika relapsu: I. <1% HCS – nízke riziko

II. 1-5% HCs – intermediárne riziko

III. >5% HCs – vyššie riziko

Prietoková cytometria - je limitovaná získaním reprezentatívneho dreňového materiálu.

Kompletná eradikácia MRD sa zatiaľ neodporúča, benefit oproti rizikám s predĺženou liečbou je neistý.

Pri rozhodovaní o ďalšej liečbe môže pomôcť súčasné sériové stanovenie hladiny solubilného receptora IL-2.

Liečebné modality HCL

Do začiatku 80-ych rokov medián prežívania 4 roky.

Od začiatku éry purínových analógov žijú mnohí pacienti už 30 rokov,

- ❖ **splenektómia** - *splenomegalia ≥ 10 cm pod RO*
tehotenstvo (?)
- ❖ **interferón-alfa** - *úvod pred chemoterapiou pri ťažkej cytopénii,*
3 MU 3xtýždenne s.c.
- ❖ **purínové analógy** : *cladribin (Leustatin, Litak)*
pentostatin (Nipent)

ORR > 95%

CR > 75%

Štandardná liečba

cladribin (*Litak*) - jeden cyklus

- 0,14 mg/kg/d sc bolus 5 dní

Hodnotenie efektu: *biopsia drene 4-6 mesiacov po liečbe*

Nedosiahnutá KR = *podať 2.cykľus cladribin*

(DFS po KR je 5x dlhšie ako po PR)

*pentostatin (Nipent) - 4 mg/m² á 2 týždne, biopsia drene po 8-9 cykloch,
po KR podať ešte 1-2 cykly*

Neregistrovaný!

Liečba relabujúcej/refraktérnej HCL

Relaps po 2 rokoch

- ❖ cladribin (2.KR - 68%, 3.KR - 47%)

Relaps do 2 rokov

- ❖ cladribin + rituximab (KR – 89%)

Neštandardná liečba:

- ❖ fludarabin / bendamustin + rituximab, **ibrutinib**, SE, INF

Nová liečba:

- ❖ inhibítory BRAF kinázy: vemurafenib (*Zelobraf*)
- ❖ kombinácia: inhibítor BRAF + inhibítor MEK (*Mekinist*)
- ❖ rekombinantný imunotoxín anti-CD22 **moxetumomab pasudotox**

Paralela cielenej liečby?

➤ CML

➤ gén **BCR/ABL**



tyrozínkináza BCR/ABL

➤ tyrozínkinázový inhibítor
imatinib (Glivec)



apoptóza buniek CML

➤ HCL

➤ gén **BRAF V600E**



serín/treonín kináza B-Raf

➤ serín/treonín inhibítor
vemurafenib (Zelobraf)



apoptóza buniek HCL

Záver I.

- ❖ HCL je zvláštna klinicky (*lymfoproliferácia bez lymfadenopatie*) i laboratórne (*leukémia bez leukocytózy, bizarné strapaté bunky*).
- ❖ Poznáme už pravdepodobnú patogenetickú príčinu HCL = mutácia BRAF V600E.
- ❖ cHCL s expresiou IgHV4-34 je BRAF negatívna, má zlú prognózu.
- ❖ Variantná HCL je BRAF negatívna, nepokladá sa za príbuznú klasickej HCL.

Záver II.

- ❖ Dosiahnutie kompletnej remisie je pre prognózu dôležité, význam MRD ešte nie je jednoznačný.
- ❖ Existencia liekov inhibujúcich BRAF kinázu umožní cielenú liečbu (apoptóza len leukemických buniek).
- ❖ Cielenou liečbou je tiež použitie anti-CD22 rekombinantného imunotoxín, prínos potvrdia prebiehajúce štúdie.

Vlastný súbor pacientov s HCL a vyšetrenou mutáciou BRAF

n=12 M:Ž=9:3 vek=50-81 rokov (M= 65)
počet vyšetrení=14

HCL bez remisie (*2xpred 1.liečbou, 6x relaps*):

8 vyšetrení = 8x BRAF pozit

HCL v KR: **6 vyšetrení = 6x BRAF negat**

Mutácia BRAF V600E a HCL

Tiacci et al, N Engl J Med, 2011

Pozitivita BRAF: 47 pts ... **HCL** **100%**
195 pts ... **iné B-NHL** ... **0%**

Arcaini et al, Blood, 2012

Pozitivita BRAF: 62 pts ... **HCL** **100%**
178 pts ... **iné B-NHL** .. 2 pts
(SMZL, WM, B-CLPD)

Prvá genetická anomália potvrdzujúca diagnózu HCL.

Mutácia BRAF V600E a HCL

Xi Liqiang et al, Blood 2012

Pozitivita BRAF: 53 pts ...**cHCL** ...**79%**

16 pts ...**vHCL** ... **0%**

Negativita BRAF: 11 pts ... cHCL ...21%

(z nich 5 pts *IgVH4-34+*)

Prvý prípad liečby HCL vemurafenibom

51-ročný muž

cladribin, pentostatin, rituximab+cladribin = bez efektu

BRAFV6004 pozit

vemurafenib 2x240 mg → 1440 mg /deň

Deň liečby	Slezina (cm)	ANC ($\times 10^9/l$)	Tr ($\times 10^9/l$)	sCD25 (U/ml)	HC perif	HC dreň	BRAF V600E
0.	25 x 8	0,68	36	24 800	-	70%	pozit
16.	14 x 5	-	-	-	-	14%	-
28.	-	-	140	< 900	-	-	-
36.	-	>1,5	-	-	0%	-	negat
56.	norma	3,8	150	-	-	<0,1%	-

KR trvá 6 mesiacov

Dietrich S et al, N Engl J Med, 2012;366:2038-2040
Dietrich S et al, J Clin Oncol, 2013;31(19):300-303