

Przewlekła białaczka limfocytowa (CLL) jest najczęstszym nowotworem układu chłonnego w Polsce, charakteryzuje się akumulacją patologicznych limfocytów B, podlegających nieustannej ewolucji klonalnej podczas trwania choroby. CLL jest chorobą przewlekłą i dotychczas nieuleczalną oraz ma różnorodny przebieg kliniczny wynikający, między innymi, z oporności na apoptozę oraz heterogenności genetycznej. Celem leczenia CLL jest uzyskanie pełnej remisji i przedłużenie życia. Dotychczas, w leczeniu CLL najczęściej używane są analogi nukleozydów purynowych i leki alkilujące: fludarabina z cyklofosfamidem i immunoterapią rytuksymabem (R) (R-FC) oraz bendamustyna w połączeniu z R (R-B). Z uwagi na liczne nowe przypadki CLL, istotnym zagadnieniem jest poszukiwanie nowych czynników prognostycznych, które mogą być pomocne w wyodrębnieniu pacjentów z różnorodnymi profilami immunofenotypowymi i cytogenetycznymi odpowiedzialnymi za indywidualny przebieg choroby. Wybór leczenia, w oparciu o ocenę indywidualnej wrażliwości komórek CLL na zastosowane schematy leczenia, umożliwiłaby spersonalizowanie leczenia. Wydaje się więc, iż ważnym zagadnieniem może być ocena wrażliwości komórek CLL na apoptozę indukowaną R-FC lub R-B w warunkach *in vitro* oraz porównanie, czy ocena żywotności komórek mogłaby być przydatna do przewidywania wyników leczenia. Ponadto, nie można wykluczyć, że zmiany w układzie immunologicznym chorego, w trakcie leczenia mogą korelować z końcowymi wynikami terapii.

W pierwszej części pracy analizowano parametry cytometryczne i cytogenetyczne u 239 pacjentów z CLL o różnych cechach klinicznych. Skoncentrowano się na znaczeniu czynników prognostycznych, ich wzajemnych korelacjach, wpływie na czas przeżycia oraz odpowiedzi na leczenie.

Druga część pracy obejmowała porównanie działania cytotoksycznego *in vitro* mieszanin leków stosowanych rutynowo w schematach leczenia (R-B oraz R-FC podawanych w 6 cyklach w odstępach co 28 dni) na ludzkie komórki krwi pochodzące od chorych ze zdiagnozowaną CLL. Celem było zbadanie, czy testem wrażliwości na leki *in vitro*, można przewidywać wynik leczenia u 21 pacjentów z CLL. Obserwacje leczonych pacjentów dotyczyły badania zmian populacji limfocytów krwi po kolejnych kursach leczenia.

Material

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa oraz zawiesina komórek, uzyskanych dzięki biopsji cienkoigłowej węzłów chłonnych, chorych diagnozowanych w Pracowni Cytometrii Przepływowej. Do badania zastosowano metodę cytometrii przepływowej z wykorzystaniem

szerokiego panelu przeciwciał do oceny antygenów powierzchniowych oraz cytoplazmatycznych komórek. Wykonano ocenę czynników prognostycznych: CD38, CD49d, analizowano kariotyp oraz wyniki badania FISH. Dodatkowo oceniono medianę intensywności fluorescencji MFI CD20 i MFI BCL2 na komórkach CLL. Próbkę krwi do badań *in vitro* od pacjentów z CLL pobierano przed leczeniem oraz po każdym kursie leczenia. Komórki inkubowano z mieszaninami leków, analizowano za pomocą cytometrii przepływowej, a następnie oceniano pod kątem odpowiedzi klinicznej. Układ immunologiczny oceniano poprzez ocenę procentową populacji limfocytów i liczbę bezwzględną limfocytów B, komórek CLL, limfocytów T oraz komórek NKCD56^{dim} i NKCD56^{bright} oraz komórek NKTCD56^{dim} i NKTCD56^{bright} przed leczeniem, po każdym kolejnym kursie leczenia oraz po zakończeniu leczenia.

Wyniki

1. Wykazano obecność wzajemnych korelacji między badaniami cytometrycznymi i cytogenetycznymi o znaczeniu prognostycznym u pacjentów z CLL, które mogą być odpowiedzialne za indywidualny przebieg choroby oraz odpowiedź na leczenie. Dodatkowo, wykazano, że ocena cytometryczna MFI CD20 i BCL2 i rodzaj materiału diagnostycznego mogą mieć również znaczenie prognostyczne w CLL.
2. Ekspozycja próbek krwi na mieszaniny leków R-F i Maf oraz R-B w różnych stężeniach u poszczególnych pacjentów *in vitro* z oceną żywotności komórek może być przydatna do oceny odpowiedzi na leczenie u indywidualnych pacjentów. U 76% pacjentów wykazano silne korelacje z badaniami *in vivo*. Silną korelację obserwowano między stężeniem leków *in vitro* a liczbą komórek CLL i NK we krwi.
3. Podczas leczenia u pacjentów z CLL obserwowano korelację liczby komórek CLL z liczbą komórek NKCD56^{bright}, co może być wykorzystane do liczbowej oceny wyniku leczenia pacjentów, jednak nie zależy od liczby komórek CLL przed leczeniem. A zatem poza oceną kliniczną leczenia scharakteryzowaną jako CR, PR i nawrót, równie ważna okazała się ocena liczbową wyniku leczenia, która mogłaby być podsumowującą oceną dodatkową, opartą również na odpowiedzi określonej jako CR/PR/nawrót. Niektóre z prezentowanych w pracy obserwacji prognostycznych CLL są nowe, nie publikowane w literaturze.

Słowa kluczowe:

przewlekła białaczka limfocytowa, czynniki prognostyczne, cytometria przepływowa, zmiany subpopulacji limfocytów w przewlekłej białaczce limfocytowej w trakcie leczenia