

Co nám v každodenní praxi skutečně říkají tzv. moderní prognostické faktory u chronické lymfatické leukemie?

Mayer J.¹, Schwarz J.², Doubek M.¹, Brychtová Y.¹, Brejcha M.³, Pospíšilová Š.¹, Trbušek M.¹, Kuhrová V.¹

za organizaci Česká leukemická skupina - pro život, THE CZECH LEUKEMIA STUDY GROUP – FOR LIFE, CELL

¹Interní hematologická klinika FN Brno, Brno, ²Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha,

³Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín

Souhrn

Představy o patogenezi a prognostických znacích chronické lymfatické leukemie (CLL) se v posledním desetiletí výrazně změnily. Objevilo se mnoho nových prognostických faktorů (ZAP-70, ATM, cytogenetická, molekulárně genetická a funkční analýza genu p53; mutační stav IgV_H, microRNA). Na druhou stranu indikace pro zahájení terapie se u CLL stále opírá o konvenční hematologické a klinické nálezy i přesto, že máme k dispozici nové a účinné léčebné postupy. Přesná role nových prognostických znaků CLL tak stále zůstává nejasná. Náš přehled se zaměřuje na čerstvé pokroky v diagnostice a stanovení prognózy pacientů s CLL s důrazem na jejich důsledky pro klinický přístup k nemocným s CLL. Stratifikace pomocí nových biologických prognostických znaků může vést k vylepšení péče o nemocné a ukazuje směr budoucího klinického výzkumu.

Klíčová slova: chronická lymfatická leukemie, nové prognostické faktory, léčba

Summary

Mayer J., Schwarz J.¹, Doubek M., Brychtová Y., Brejcha M.², Pospíšilová Š., Trbušek M., Kuhrová V.: What can we currently learn from new prognostic markers of chronic lymphocytic leukemia in the everyday haematological practice?

The opinions about the pathogenesis and prognostic factors of chronic lymphocytic leukemia (CLL) have undergone significant changes over the past decade and a variety of new prognostic factors have been discovered (ZAP-70; ATM; cytogenetic, molecular genetic and functional analysis of p53; a mutational status of IgV_H; microRNA). On the other hand, however, indication for the start of therapy continues to be based on the conventional hematological and clinical findings, while a range of new and effective therapeutic procedures is now used in the CLL therapy. The exact current role of the new prognostic markers of CLL therefore remains undefined. This review focuses on the most recent advances in the diagnostic and prognostic examination of patients with CLL, with particular emphasis on their implications in clinical management. Risk stratification using biological prognostic markers can improve current patient care and direct future clinical research.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, new prognostic factors, treatment

Trans. Hemat. dnes, 13, 2007, No. 3, p. 106–116.

Úvod

V poslední době jsme svědky počínající nepřehlednosti v oblasti poznání biologie chronické lymfatické leukemie (CLL). Ještě před 10 lety se klinikům tato nemoc zdála relativně „jednoduchá“, i když bylo více než zřejmé, že někteří nemocní mají dobrou prognózu, zatímco u jiných se choroba chová agresivně. Nebylo ale zcela jasné, čím to je způsobeno. Najednou se objevila řada prací o **mutačním stavu genu pro těžký řetězec imunoglobulinů (IgV_H), kináze ZAP 70, expresi CD38, genu p53, mnohých cytogenetických nálezech a dalších abnormalitách**. Není zcela snadné se v záplavě různých informací orientovat. Přehnaný důraz na některé nové prognostické markery by dokonce mohl vést k nesprávným terapeutickým závěrům.

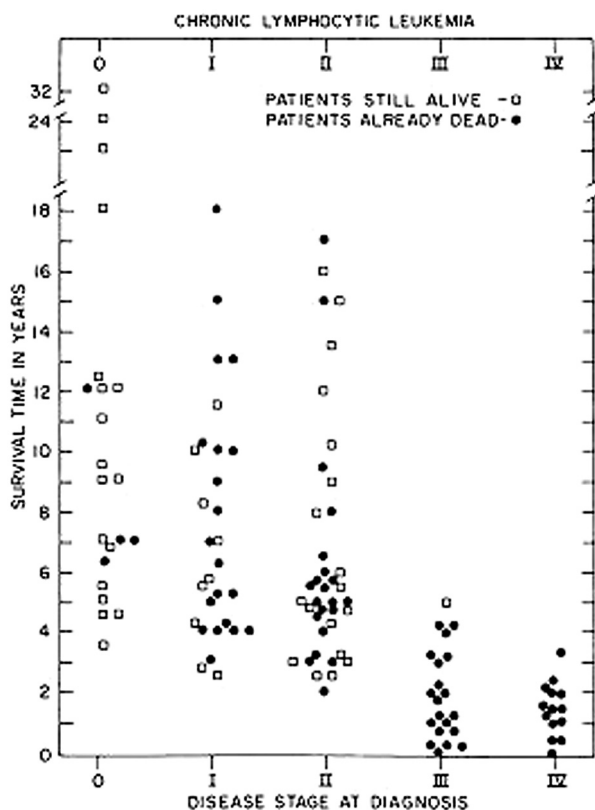
Účelem tohoto sdělení je **co možná nejjednodušší formou** seznámit čtenáře s některými **novými prognostickými**

mi znaky, ukázat, jak byly objeveny, a naznačit, jaký mají **reálný význam**. Nebudeme se pouštět do hlubších teoretických rozvah, nebude-li to zcela nezbytné pro pochopení souvislostí. Pokusíme se také ukázat existující **problémy** při interpretaci některých laboratorních nálezů, položíme si otázky k čemu jednotlivé prognostické markery slouží a co ovlivňují. **Význam některých prognostických znaků se může dokonce měnit se změnou léčby** (1). Někdy také není zcela jednoduché odlišit, co je primární, nezávislý, patofyziologicky významný prognostický znak a co marker zástupný, zprostředkovaný, závislý na znaku primárním. Na druhou stranu, některé věci se s hlubším poznáním začínají vyjasňovat a je vidět, jak mnohé dřívější poznatky do sebe začínají „logicky zapadat“.

V poslední době se na toto téma i v české literatuře objevily velmi kvalifikované práce, jak přehledné (2), tak shrnující vlastní zkušenosti (3). Přesto se domníváme, že naše práce je potřebná, neboť podobnou problematiku představuje zase z jiného úhlu pohledu.

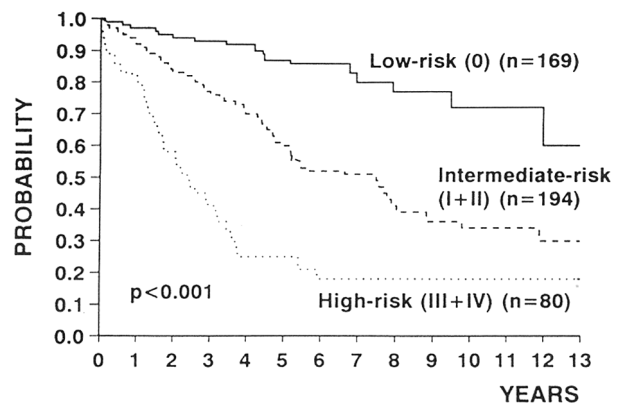
Klasické prognostické markery

Než se dostaneme k moderním, novým, molekulárně definovaným prognostickým ukazatelům, je vhodné stručně shrnout základní informace o déle známých, klasických prognostických faktorech. První široce přijatý systém klasifikace CLL byl publikován v roce 1975 – **systém podle Raie** (4). Profesor Rai je dodnes aktivní na poli CLL. Další podobný systém publikovali **Binet et al.** (5, 6). Oba tyto prognostické systémy vycházejí z velmi jednoduchých a snadno dostupných klinických a laboratorních parametrů, k nimž náleží počet postižených, infiltrovaných lokalit (uzliny a játra nebo slezina, hodnoceno pouze klinicky) a hodnoty hemoglobinu a trombocytů. Tyto prognostické systémy vycházely z dřívějších pozorování, že více vyjádřené abnormální nálezy byly vidány u nemocných s horší prognózou. Pro ilustraci jsou výsledky práce Raie et al. (4) ukázány na obrázku 1. Je z něj patrné, že nemocní v pokročilejších stadiích nemoci dříve a často umírali.

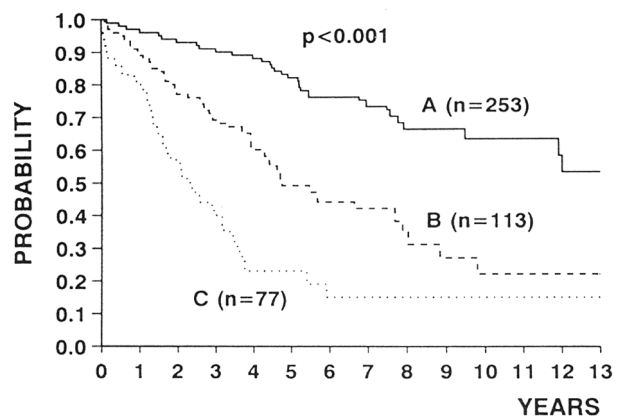


Obr. 1. Zobrazení prognostického významu stadií chronické lymfatické leukémie (CLL) podle originální práce Raie et al. z roku 1975 (4).

Systém podle Raie byl posléze upraven tak, že stadia I a II, a také III a IV byla vždy spojena dohromady. Oba tyto systémy, podle Raie i Bineta, se používají dodnes a mají stále svoji hodnotu. Vypovídají o **přežití nemocných** (obr. 2 a 3). Již na tomto místě upozorníme na jednu zcela zásadní věc. Pacienti ve sledovaných souborech byli různě léčeni, a tak se dá říci, že Raiův systém a Binetův systém vypovídají o přežívání nemocných do jisté míry bez ohledu na terapii. Uvedené obrázky, stejně jako řada dalších studií, jsou ze starší doby, před érou



Obr. 2. Přežívání nemocných podle stadia choroby, stanoveného podle Raie v modifikaci. Podle: Montserrat a Rozman, 1993 (7).



Obr. 3. Přežívání nemocných s chronickou lymfatickou leukémií podle stadia choroby, stanoveného podle Bineta. A – stadium Binet A, B – stadium Binet B, C – stadium Binet C. Podle: Montserrat a Rozman, 1993 (7).

modernějších léčebných postupů, které snad prognózu pacientů změnit mohou. Velmi závažnou otázkou, zda terapií můžeme změnit prognózu CLL, zatím na tomto místě ponecháme otevřenou. Budeme vycházet z toho, že běžně podávané léky, jako alkylační látky nebo fludarabin, **celkové přežití pacientů neovlivňují**.

Kromě výše zmíněných základních klinických prognostických faktorů byla popsána ještě celá řada dalších relativně jednoduchých faktorů. Hodnocení jejich skutečného významu ale není snadné. Vždy bychom museli vyjít z konkrétní studie, z konkrétního souboru nemocných a z jeho homogenity nebo nehomogenity stran podávané terapie. Další klasické faktory asociované se špatnou prognózou CLL jsou následující (7, 8):

- 1. Klinické:** pokročilý věk, mužské pohlaví, velký rozsah choroby („bulky“ choroba), špatný celkový stav (*performance status*).
- 2. Hematologické:** vysoká koncentrace lymfocytů, velké a atypické lymfocyty v krvi, granulocytopenie, extenzivní infiltrace dřeně (> 80 %), difúzní charakter infiltrace dřeně, zvýšená sedimentace červených krvinek.
- 3. Laboratorní:** zvýšená LD, hypoalbuminémie, zvýšená koncentrace kyseliny močové, zvýšená sérová alkalická fosfatáza, zvýšená koncentrace urey, krea-

tininu, zvýšená koncentrace kalcia, zvýšená exprese bcl-2.

4. **Imunologické:** hypogamaglobulinemie, různé abnormality imunofenotypu, Coombs pozitivní anémie, zvýšená koncentrace β 2-mikroglobulin, zvýšený sérový solubilní CD25, zvýšený sérový solubilní CD23.
5. **Kinetické parametry:** krátký zdvojovací čas koncentrace lymfocytů, zvýšená tymidinkináza, zvýšená reaktivita na mitogeny, zvýšený počet buněk v S fázi, Ki-64, PCNA.
6. **Další:** špatná odpověď na terapii, gen vícelékové rezistence (MDR). Je naprosto zřejmé, že mnohé faktory neodrážejí hlubší molekulární změny v CLL buňkách, že to nejsou primární faktory, které samy o sobě ovlivňují průběh choroby a dávají zásadní informaci o prognóze. Jiné ale určitý prognostický význam mít mohou. Například mírná lymfocytóza, do $40\text{--}50 \times 10^9/\text{l}$, je prognosticky příznivá u klinických stadií mírného a středního rizika. Problém těchto faktorů je také v **určení rizika progresu při stanovení diagnózy**. To žádný starší prognostický model spolehlivě neumožňuje, a tak podle něj není možné stanovit, jak dlouho zůstane konkrétní nemocný v tom stadiu, v jakém byl diagnostikován. Pro některé nemocné se proto používal termín „smouldering“ CLL, zahrnující zpravidla: klinické stadium Binet A, nedifuzní infiltraci kostní dřeně, hemoglobin $\geq 120\text{--}130\text{ g/l}$, lymfocyty v periferní krvi $\leq 30 \times 10^9/\text{l}$, zdvojovací čas koncentrace lymfocytů v periferní krvi > 12 měsíců, lymfocyty v nátěru kostní dřeně $< 80\%$ a počet zvětšených uzlinových oblastí pod 2. Takoví nemocní měli vysokou šanci, kolem 80% , že i po 5 letech zůstanou v klinickém stadiu A (7).

V závěru jednoho velmi precizního přehledu z roku 1998 od velmi renomovaných autorů si je možné přecíst, že pro běžnou klinickou praxi dostačuje u pacienta s CLL základní klinické a laboratorní vyšetření s určením stadia choroby. Vyšetření cytogenetické, FISH nebo dokonce molekulární studie tehdy nebyly všeobecně indikovány (8). Co se od té doby zásadně změnilo?

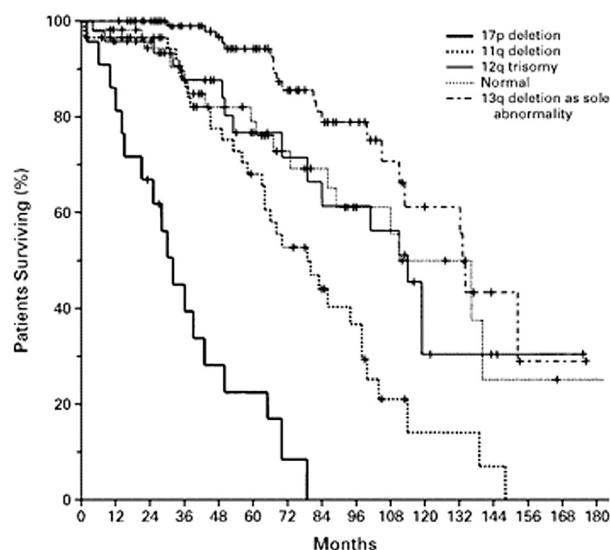
Nové, moderní prognostické ukazatele

Moderních prognostických ukazatelů je dnes u CLL již celá řada. Podrobněji, ale stále s důrazem na jednoduchost a praktičnost, se budeme věnovat **cytogenetickým nálezům, mutačnímu stavu genu pro IgV_H, kináze ZAP 70, expresi CD38 a genu p53**. Další markery probereme stručněji.

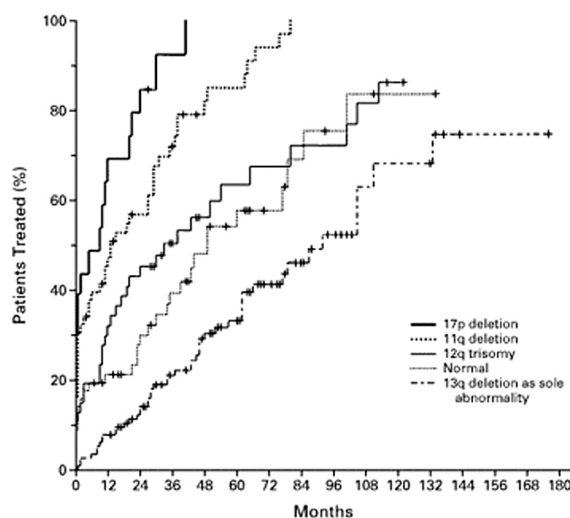
Cytogenetika

Vývoj poznání

Zásadní práce o významu cytogenetických nálezů pro prognózu nemocných s CLL byla publikována v roce 2000 (9). Už do té doby se sice vědělo, že patologické cytogenetické nálezy se u CLL vyskytují, a ukazovaly se některé jejich prognostické souvislosti, nicméně nálezy



Obr. 4. Pravděpodobnost přežití u nemocných s chronickou lymfatickou leukémií s různými cytogenetickými nálezy. Podle: Döhner et al., 2000 (9).



Obr. 5. Pravděpodobnost přežití bez progresu choroby u nemocných s chronickou lymfatickou leukémií s různými cytogenetickými nálezy. Podle: Döhner et al., 2000 (9).

nebyly jednoznačné hlavně proto, že konvenční cytogenetická vyšetření jsou u CLL problematická pro malou mitotickou aktivitu buněk. Döhner et al. od roku 1990 do roku 1998 systematicky vyšetřovali 325 nemocných většinou před zahájením terapie pomocí více DNA sond metodou interfázní FISH (*fluorescence in situ hybridization*), čímž obešli klasické cytogenetické metody. Tímto způsobem našli chromozomální aberace u 82% nemocných a ukázali na zásadní prognostický význam některých z nich (obr. 4 a 5).

Moderním cytogenetickým metodám u CLL se poměrně záhy věnovali také čeští autoři (10, 11).

Současný stav

Cytogenetické vyšetření pomocí panelu FISH sond se stává součástí hodnocení rizika nemocných s CLL. O CLL máme množství nových informací, objevily se

další nové metody vyšetřování a nálezy. Potvrdilo se, že cytogenetické nálezy 17p- a 11q- jsou prognosticky nepříznivé, zatímco nález 13q- je považován za prognosticky příznivý. Význam nálezu +12 je z prognostického hlediska diskutabilní.

Jaké jsou cytogenetické nálezy u nově diagnostikovaných nemocných a jaký je jejich vývoj v čase? Patologické cytogenetické nálezy jsou velmi frekventní již u nově diagnostikovaných nemocných a jsou nalézány u 75–80 % nemocných (12, 13). Velmi zjednodušeně lze říci, že nejčastější abnormalitou je 13q delecí (kolem 50 % nemocných), následovaná 11q delecí a trizomií 12. chromozomu (kolem 20 %). 17p delecí bývá přítomna asi u 10 % nemocných. Při podrobnějším cytogenetickém vyšetření lze ale najít i další abnormality. Řada nemocných má **změny kombinované, komplexní** (12). S přibývajícím dobou od stanovení diagnózy se **mohou objevovat další cytogenetické změny** (13). Zdá se, že další klonální změny jsou častější u nemocných s pozitivitou ZAP-70 a že změny prognosticky závažného charakteru se častěji objevují u pacientů s nemutovaným stavem IgV_H (13).

O čem vlastně cytogenetické změny prakticky vypovídají? Již výše byl uveden jejich vliv na celkové přežití a na přežití bez progresu choroby. Je nutné však zdůraznit, že v různých studiích se výsledky přežití mohou lišit, podle toho, jací nemocní byli do studie zařazeni a jak byli léčeni. Některé změny jsou však **velmi zásadní, zejména 17p-**. V německé studii testující fludarabin oproti kombinaci fludarabin a cyklofosfamid (14) se ukázaly následující závislosti: 13q- je častější u nemocných s mutovaným IgV_H, 11q- a 6q- jsou častější u nemutovaného IgV_H, ORR (*overall response rate*) je nižší u 17p-, PFS (*progression free survival*) je kratší u 11q-, 14q- a 17p-, medián OS (*overall survival*) je kratší u 17p- při univariátní analýze (tedy nezjištěna závislost na mutačním stavu IgV_H), při multivariátní analýze bylo zjištěno pouze kratší PFS u monoterapie fludarabinem pacientů se 17p-. Stran OS je zásadní vztah k 17p- (17p- zkracuje OS). Velmi podrobná data ilustrující komplexnost problematiky prognostických faktorů u CLL ukázala studie testující alemtuzumab oproti chlorambucilu u nově diagnostikovaných nemocných s CLL, na níž se výrazně podíleli také čeští autoři (12, 15). CR (*complete remission*) byla častější v rameni s alemtuzumabem a 13q-, ORR (*overall response rate*) byl častější u alemtuzumabu a 11q-, 13q- a hraničně u 17q-, PFS byl delší u alemtuzumabu a 13q- a hraničně u +12. Přes výrazný rozdíl v PFS u 17p- ve prospěch alemtuzumabu statistická signifikace nevyšla pro malý počet nemocných.

Výhled

Je třeba precizně stanovit správnou metodiku vyšetření FISH a zabývat se podrobněji tím, **v kolika procentech buněk se změny vyskytují, zdali na jednom či na obou chromozomech a jaký to má význam**. Objevují se ale i další metody a zdokonalení, což bude vyžadovat studium a ověřování na nových souborech nemocných. Dicker et al. (16) popisují zlepšení konvenčního cytogenetického vyšet-

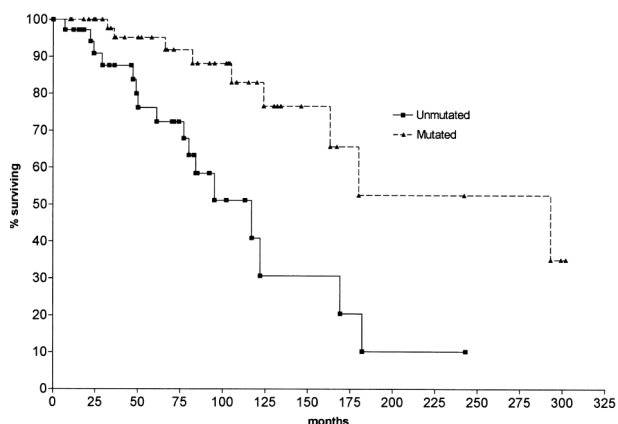
ření speciální kultivací buněk. Byli tak schopni nalézt daleko více patologických změn než při FISH vyšetření. Mayr et al. (17) při využití podobné techniky kultivace a metafázového cytogenetického vyšetření popisují vysoký výskyt **chromozomálních translokací** (34 %). Tyto translokace postihovaly různé chromozomy a měly prognostický význam. Žádná translokace specifická jen pro CLL však popsána nebyla. Přítomnost translokací a také **komplexního karyotypu** (3 a více změn) měla zásadní význam pro přežití bez potřeby terapie a pro celkové přežití pacientů s CLL. Přítomnost translokací se často družila s dalšími nepříznivými znaky nebo negativně ovlivňovala znaky příznivé, jako 13q-. Je tedy zcela evidentní, že současné zjednodušené pohledy na cytogenetické FISH vyšetření, byť jsou velmi přínosné a otevírají nový pohled na stratifikaci nemocných, nejsou zdaleka zcela přesné.

Mutační stav genu pro těžký řetězec imunoglobulinů Vývoj poznání

Geny pro imunoglobulinové řetězce prodělávají bezprecedentní rekombinaci předtím, než vznikne finální funkční gen ve zralé B buňce. Různě se seskupují a dále upravují z několika různých částí (segmentů). Segmenty u těžkého řetězce (H, *heavy*) se nazývají V (*variable*), D (*diversity*) a J (*joining*). Lehké řetězce nemají D. Tento rekombinanční proces je v rámci genomu zcela výjimečný a existuje pouze u obratlovců. Zabezpečí se tím, že může vznikat obrovské množství možností imunoglobulinových molekul při relativně omezeném počtu segmentů, což je nesrovnatelně ekonomičtější, než kdyby každý kompletní imunoglobulin měl svůj vlastní celý gen. Během VDJ rekombinace do celého procesu vstupuje řada dalších faktorů, zvyšujících celkovou variabilitu finálního genu: různé možnosti v rámci celé rekombinace, ztráty části segmentů, nebo náhodného vmezeřování nových (N) nukleotidů. Celý řetězec naivní B buňky potom sestává z části (oblasti) variabilní (V) a konstantní (C, *constant*). (Terminologicky jde o jistý problém. Celý řetězec, ať již lehký, nebo těžký, sestává z variabilní části V a konstantní části C. Přitom variabilní část se skládá z rekombinovaných segmentů V, D a J. Písmeno V se tedy používá jak pro označení variabilní oblasti celého imunoglobulinového řetězce, tak segmentu, který je jen součástí genu pro finální variabilní úsek. Označení V_H potom znamená celý variabilní úsek těžkého řetězce). Po setkání **naivní B buňky** s antigenem dojde za pomoci T buněk v **germinálních centrech** ještě k tzv. **somatické mutaci** (označované i jako hypermutace) ve variabilní (tedy ne konstantní) oblasti. To, že se imunoglobulinový gen musí skládat ze segmentů, bylo teoreticky navrženo již v roce 1965 (18). Bylo to potvrzeno v 70. letech 20. století. Ve stejné době pak byly objeveny i somatické hypermutace. Od té doby ale ještě nejsou všechny mechanismy tohoto komplikovaného procesu zcela rozluštěny.

Současný stav

Jak se problematika somatických mutací dostala tak náhle do oblasti zájmu u CLL? S narůstajícími znalostmi



Obr. 6. Přežití pacientů s chronickou lymfatickou leukémií podle mutačního stavu IgV_H. Podle: Hamblin et al, 1999 (21).

o přesné genové sekvenci jednotlivých segmentů pro V_H a s dalším studiem imunoglobulinové molekuly CLL buněk se začalo ukazovat, že existují nemocní, kteří **mají hypermutace genu pro IgV_H**, což by znamenalo, že jejich leukemie pochází z buňky, která byla vystavena antigenní stimulaci, ale také nemocní, kteří **hypermutace nemají**, a u nichž by tedy leukemie pocházela z buněk naivních (19, 20). V roce 1999 byly potom publikovány dvě zásadní práce, které ukázaly na rozdílnou prognózu nemocných s mutovaným nebo nemutovaným IgV_H (21, 22). Hamblin et al. (21) ukázali, že nemocní s nemutovaným IgV_H měli častěji atypickou morfologii lymfocytů, +12, pokročilejší a progresivní chorobu. Náhodně bylo vyšetřeno celkem 84 nemocných z rozsáhlé databáze kliniky autorů. Nejdelší sledování jednoho pacienta bylo 25 let. Nemocní byli v průběhu choroby léčeni tak, jak to jejich stav vyžadoval. Nezdálo se, že by se mutační stav během vývoje choroby měnil. Přežití nemocných se zásadně lišilo podle mutačního stavu (obr. 6).

Stanovení mutačního stavu je laboratorně poměrně komplikované, vyžaduje sekvenaci a porovnání s nemutovanou sekvencí, která je dostupná v různých databázích (23). Tam ale nemusí být identické informace (24). Jako mutovaný se zpravidla označuje IgV_H s méně než 98% sekvenční homologií. Tato hodnota byla stanovena víceméně arbitrárně, poněvadž se uvažovalo, že některé sekvenční změny mohou být způsobeny polymorfismy. Podrobnější práce zkoumající granulocyty i lymfocyty nemocných ale ukázala, že polymorfismy jsou zodpovědné jen za minimum změn (25). Bylo také publikováno několik prací, které zkoumaly rozdíly v prognóze nemocných s různou procentuální hranicí pro mutované IgV_H. Tyto práce ukázaly, že prognóza nemocných se může lišit podle zvolené procentuální hranice (26). Nicméně 2% hodnota je užívána nejčastěji. Ukázalo se též, že nemocní, jejichž imunoglobulin v CLL buňkách využívá **segment V_H3-21**, mají horší prognózu bez ohledu na mutační stav (27).

Mutační stav je další významný prognostický ukazatel, který je nezávislý na klasickém klinickém stadiu choroby. To se zahrnutím mutačního stavu dále doplní a zpřesní (28). V současnosti se mutační stav u řady

nemocných vyšetřuje, ale **nelze zatím jednoznačně říci**, že se lze **jen podle tohoto kritéria rozhodovat** u konkrétních nemocných o tom, zdali se má léčba podat nebo ne. Do současnosti bylo publikováno množství dalších prací, které prognostický význam mutačního stavu zkoumaly a potvrdily jeho vliv. Negativní prognostický vliv lze pravděpodobně zvrátit alogenní transplantací, autologní nikoliv (29).

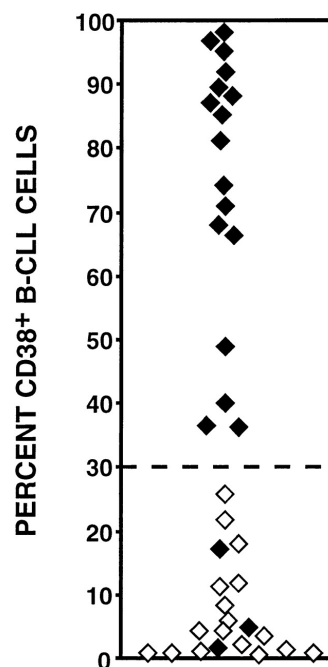
Výhled

Podrobné studium mutačního stavu, vztahu k prognóze, typů imunoglobulinového genu a dalších souvisejících aspektů přineslo a přináší řadu dalších nových poznatků ohledně patogeneze CLL a typu buňky, z níž CLL vzniká. Mnohé práce jsou velmi experimentální a podrobně je zde nezmiňujeme. Je však jisté, že v blízké budoucnosti budeme využívat i daleko praktičtější plody těchto výzkumů.

CD38

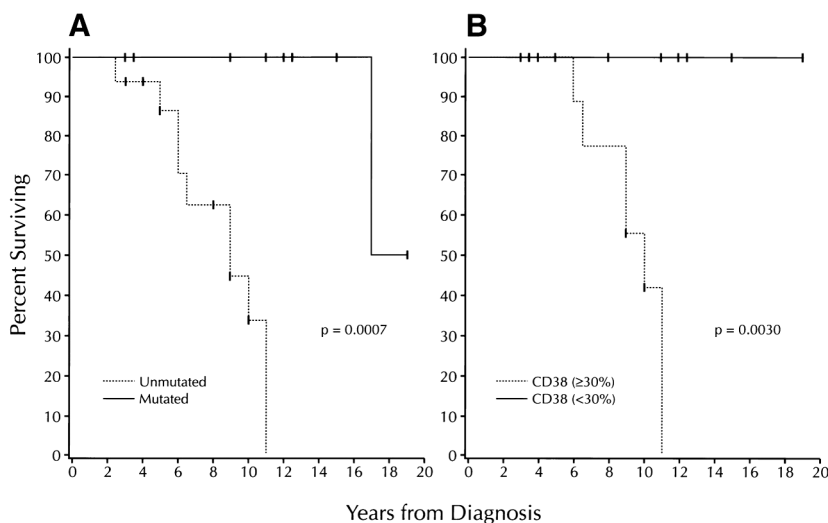
Vývoj poznání

CD38 je důležitá fylogeneticky stará molekula, nacházející se u člověka jako transmembránový protein na různých lymfocytech v různých vývojových stadiích. Má řadu funkcí, mnohé z nich nejsou ještě zcela objasněny. U lymfocytů B řady je exprimována na jejich prekurzorech. Na klidových B lymfocytech není a objevuje se až po aktivaci naivních B lymfocytů. Její exprese kulminuje u lymfocytů v germinálních centrech, posléze zase klesá až k nepřítomnosti u paměťových buněk. Je také exprimována na terminálně diferencovaných plazmatic-



Obr. 7. Vztah mutačního stavu a exprese CD38 u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií. Nemocní s mutovanými imunoglobuliny mají zpravidla expresi CD38 na méně než 30 % CD5+CD19+ leukemických buněk. Prázdné čtverečky – pacienti s mutovaným IgV_H, plné čtverečky – pacienti s nemutovaným IgV_H. Podle: Damle et al, 1999 (22).

kých buňkách (30). Vzhledem k této **různé expresi během vývoje B buněk** bylo postulováno, že exprese CD38 by mohla mít vztah k mutačnímu stavu, který také charakterizuje určité vývojové fáze B řady. První práce, která studovala vztah exprese CD38, mutačního stavu a prognózy byla publikována v roce 1999 (22). Jednalo se sice jen o menší soubor 37 nemocných, ale výsledky byly velmi zajímavé. Na obr. 7 je vidět, že nemocní s mutovanými imunoglobuliny mají zpravidla expresi CD38 na méně než 30 % CD5+CD19+ leukemických buněk. Expresí CD38 se zdála být stabilní v čase a neovlivněna chemoterapií. **Prognóza pacientů s vyšší expresí CD38 byla horší**, častěji vyžadovali léčbu a měli kratší přežití, viz obr. 8. Expresí CD38 také lépe pomáhala stratifikovat nemocné střední prognostické skupiny podle Raie.



Obr. 8. Přežití nemocných s chronickou lymfatickou leukémií v letech v závislosti na mutačním stavu (A) a expresi CD38 (B). Podle: Damle et al., 1999 (22).

Současný stav a výhled

Po práci Damleho et al. (22) byla publikována celá řada prací dalších, potvrzujících prognostický význam exprese CD38. Expresí CD38 je spjata s horší prognózou, s nemutovaným IgV_H, lymfadenopatií, hepatomegalií, splenomegalií, anémií, trombocytopenií, krátkým zdvojovacím časem, vysokou koncentrací β2-mikroglobulinu, sCD23, kratším PFS a horší reakcí na fludarabin. Objevily se ale také některé práce ukazující, že vše nemusí být tak jednoduché, jak bylo dosud popsáno. **Korelace** mezi mutačním stavem a expresí CD38 **není stoprocentní**. Signifikantní část nemocných shodu v těchto markerech nemá. Přesto, nebo právě proto, je CD38 další nezávislý prognostický marker (31). Prognóza pacientů s oběma možnostmi diskordantních výsledků (IgV_H mutovaný a CD38+ nebo naopak) je stejná, zhruba intermediární oproti skupinám s velmi dobrou prognózou (oba znaky negativní) nebo se velmi špatnou prognózou (oba znaky pozitivní). U některých pacientů se také exprese CD38 může v čase měnit (31).

Změn také doznalo nazírání na expresi CD38 znaku.

Hranice, od níž jsou nálezy považované za pozitivní, je někdy uváděna jako 20% exprese (32), jindy dokonce 7% (33). Bylo také popsáno, že principiálně existují 3 skupiny CLL buněk: (téměř) kompletně CD38-, (téměř) kompletně CD38+ a směs CD38+ a CD38- buněk (34). Z této práce se zdálo, že jakákoliv přítomnost CD38+ populace CLL buněk nemá dobrou prognózu. Budoucnost patří objasnění významu a funkcí CD38 nejenom pro B lymfatickou řadu, ale speciálně pro CLL (30). CD38+ buňky tvoří asi v rámci klonu CLL zvláštní podskupinu s jinou dynamikou (35).

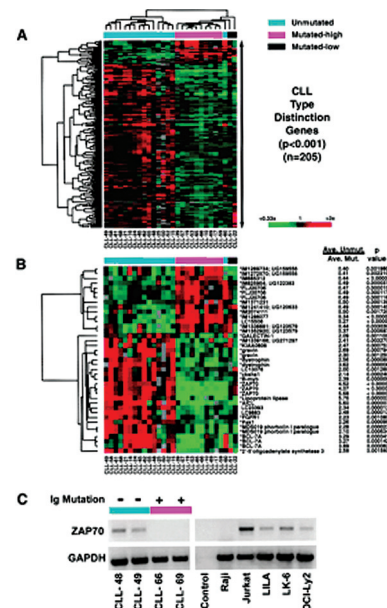
ZAP-70

Vývoj poznání

ZAP-70 (zeta-associated phosphoprotein-70) je cytoplazmatický protein s tyrozin kinázovou aktivitou, který je zcela klíčový pro vývoj a funkci T lymfocytů a je spjat s přenosem signálu přes T buněčný receptor. S rozvojem technologie DNA čipů (přehledně např. Pospíšilová a Mayer, 2005) (36) bylo zkoumáno, zdali existují rozdíly v genové expresi mezi CLL buňkami s mutovaným a nemutovaným IgV_H stavem (37). Bylo překvapivě zjištěno, že tyto rozdíly nejsou velké. Jedním z největších rozdílů byl právě gen pro ZAP-70, což je velmi neočekávaný nálezy pro B buněčnou malignitu (obr. 9).

Současný stav a výhled

Práce Rosenwalda et al. (37) podnítila další zkoumání ZAP-70 u CLL nejenom z teoretického, ale i z klinic-



Obr. 9. Různě exprimované geny u buněk chronické lymfatické leukémie s mutovaným nebo nemutovaným genem pro těžký řetězec imunoglobulinů (IgV_H). Podle: Rosenwald et al., 2001 (37).

kého pohledu. Zcela praktický problém představuje **metodika stanovení** proteinu ZAP-70. Vzhledem k tomu, že je silně exprimován na T buňkách, jakákoliv přítomnost těchto buněk mezi buňkami CLL by ukázala falešnou pozitivitu exprese ZAP-70. Proto např. pro stanovení pomocí PCR nebo Western blottingem je nutné provést selekci velmi čisté populace B buněk. Další možností je orientační vyšetření ZAP-70 pomocí histochemie, nebo stanovení flowcytometrické (38, 39). Posledně jmenované vyšetření je většinou v praxi nejvíce používáno, i když skrývá určitá metodická úskalí. ZAP-70 je na CLL buňkách exprimován různě silně a většinou se pro pozitivní hodnocení používá hranice exprese na **20 %** CLL buněk a více (38, 40). Expres ZAP-70 se jeví být v čase relativně stabilní (38, 41).

Klinické práce, které korelovaly expresi ZAP-70 s mutačním stavem a s prognózou CLL skutečně našly velmi dobrou korelaci mezi přítomností ZAP-70, nemutovaným IgV_H a horší prognózou (38–41). Přítomnost ZAP-70 se ukázala být ve vztahu s dobou dogrese choroby, s celkovým přežitím a s přežitím nemocných klinického stadia Binet A (38–41). **Korelace ZAP-70 a mutačního stavu** ale **není** stoprocentní a existují nemocní s diskordantními výsledky (38–41). Vztah mezi ZAP-70, mutačním stavem a časem od diagnózy do první terapie je na obrázku 10.

Podrobnější studium různých typů a vývojových stadií B buněk v poslední době ukázalo, že ZAP-70 není exprimován jen v T buňkách, jak se původně myslelo, ale že má zřejmě důležité signální funkce i v buňkách řady B (42).

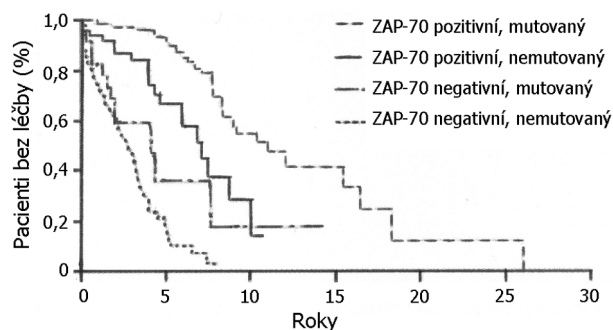
p53 a ATM

Vývoj poznání

Již jsme uvedli, jak mimořádně špatnou prognózu mají nemocní s CLL a nálezem 17p-. Na p raménku 17. chromozomu se nachází klíčový tumor supresorový gen *TP53*, kódující protein p53, dysfunkční u většiny lidských nádorů. Pokud je buňka vystavena poškozujícím vlivům, dojde k aktivaci ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*; je-li tento protein nefunkční, hromadí se DNA změny). Protein ATM potom aktivuje protein p53 fosforylací. Gen ATM je umístěn na q raménku 11. chromozomu. Ve zdravých buňkách se protein p53 nachází ve velmi malých koncentracích a je vysoce nestabilní. Je to proto, že se váže na další protein, MDM2. Po fosforylaci a aktivaci p53 je ale tato blokační vazba uvolněna a p53 může působit jako transkripční faktor regulující plejádu genů klíčových pro dělení buněk a apoptózu.

Současný stav a výhled

Situace rozhodně není tak jednoduchá, aby se dalo jednoznačně a vždy říci: 17p- rovná se nefunkční p53 a 11q- rovná se nefunkční ATM. Předně je potřeba se zamyslet nad tím, v kolika procentech buněk se tyto hrubé chromozomální změny nacházejí, a také, zdali jsou deletovány obě alely. Na druhou stranu postižení genů pro p53 a ATM může nastat **mutací** i **bez delece** raménka chromozomu. Je potřeba vzít v úvahu i to, že



Obr. 10. Vztah mezi ZAP-70, mutačním stavem a časem od diagnózy do první terapie u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií. Rozdíly mezi nemocnými ZAP-70+ s nemutovaným (spodní křivka) nebo mutovaným IgV_H (křivka nad ní) nedosáhly statistické significance. Rozdíly u ZAP-70- nemocných podle mutačního stavu statisticky signifikantní jsou, nejlepší prognózu měli pacienti ZAP-70- s mutovaným IgV_H (horní křivka). Podle: Rassenti et al., 2004 (40).

každá mutace teoreticky nemusí stejně ovlivňovat funkci proteinu. Pro podrobnější analýzu drah ATM/p53 byly vypracovány různé **funkční testy**, uplatňuje se také **sekvenace**.

Mutovaný p53 se zpravidla v buňkách kumuluje (na rozdíl od normálního nedetekovatelného p53) a může být detekován např. pomocí **Western blotu**. Korelace s mutacemi je velmi dobrá (43). FASAY (*functional analysis of separated alleles in yeast*) je funkční analýza. Transformované kvasinky s genem pro p53 od pacientů se speciálně kultivují a mutace je vidět jako změna barvy kolonií (43). CLL buňky také mohou být ozářeny a nefunkčnost p53 se projevuje neschopností indukovat např. protein p21 (44). Nemocní s mutací a nebo delecí TP53 mají signifikantně horší prognózu, ať již byli léčeni fludarabinem nebo kombinací fludarabinu a cyklofosfamid (45). Mutace v ATM genu byla také ukázána jako nezávislý závažný rizikový prognostický faktor (46).

MicroRNA

Tato problematika je velmi recentní a souvisí s objevem tzv. **RNA interference** (přehled Štruncová et al.) (47). Nedávno bylo zjištěno, že speciální dvouvláknová RNA, vznikající transkripcí v buněčném jádře, je exportována do cytoplazmy, kde po určitém zpracování může interferovat s mRNA a ovlivňovat tím tak translaci principiálně dvěma způsoby: (1) degradací mRNA, v tomto případě se jedná o tzv. siRNA, *small interfering RNA*, nebo (2) interferencí s mRNA a inhibicí translace, v tomto případě jde o tzv. miRNA, *microRNA*. MicroRNA bylo již u člověka popsáno několik set a zdá se, že to budou klíčové regulátory, uplatňující se výrazně i v procesu nádorového bujení.

Jak již bylo uvedeno, nejčastější cytogenetický nález u CLL je **13q-**, nacházený u zhruba poloviny nemocných. Dlouho a přes veškerou snahu nebylo jasné, které důležité geny jsou zde umístěny. Až s poznáním miRNA, z nichž některé se právě v oblasti 13q nacházejí, se tato otázka začala vyjasňovat. Na 13q jsou geny pro **miR-15a** a **miR-16-1** (48). Celkový profil miRNA u CLL buněk má pro-

gnostický význam a vazbu na další známé prognostické faktory, jako je ZAP-70 a mutační stav IgV_H (48).

Je vysoce pravděpodobné, že o miRNA v souvislosti s onkologií budeme ještě hodně slyšet a spekuluje se i o jejich terapeutickém využití.

Některé větší práce analyzující více moderních prognostických faktorů dohromady

Dnes již existuje řada publikací analyzujících na jednom relativně velkém souboru více moderních prognostických ukazatelů dohromady. Z již dříve popsaného a vysvětleného je evidentní, že přítomnost mnohých faktorů bude **navzájem v korelaci** (např. mutační stav, CD38, ZAP-70). Existuje však řada nemocných, kde jsou výsledky **diskordantní**. Někdy je prognóza intermediární (např. obr. 10). Kröber et al. (49) analyzovali případy diskordantního výskytu prognostických znaků ZAP-70 a mutačního stavu IgV_H. Zjistili, že diskordance v těchto dvou znacích se vyskytuje zvláště u nemocných s dalšími genetickými abnormalitami, jako je 11q-, 17p- nebo V_H3-21. Naproti tomu ale Del Giudice et al. (50) takovou závislost jednoznačně neprokázali.

Moderní prognostické znaky a prognose asymptomatických nemocných

Neprogredující choroba je často charakterizována: typickou morfolofií a imunofenotypem, CD38-, mutovaným IgV_H, nepřítomností mutace p53, nepřítomností 17p-, 11q- nebo komplexního karyotypu a přítomností 13q- (51). Gardiner et al. (52) analyzovali různé rizikové faktory. Jejich výsledky stručně shrnují tabulky 1 a 2.

Léčebná odpověď nově diagnostikovaných nemocných

V tomto případě už máme cenná data z **velkých randomizovaných studií**. Americká studie srovnávala

Tab. 1. Progrese asymptomatických nemocných s chronickou lymfatickou leukémií podle počtu rizikových faktorů: lymfocyty > 20. 10⁹/l, nemutovaný IgV_H, CD38+ a ZAP-70+ (cytogenetika nehodnocena). Podle: Gardiner et al, 2006 (52).

	Počet rizikových faktorů				
	Počet nemocných ve skupině				
	0	1	2	3	4
Progrese	11	10	11	9	3
Stabilní nemoc	44	16	3	0	0

Tab. 2. Progrese asymptomatických nemocných s chronickou lymfatickou leukémií podle počtu rizikových faktorů (cytogenetika nehodnocena). Podle: Gardiner et al., 2006 (52).

Rizikový faktor	% progredujících nemocných
Žádný	17
ZAP-70+ izolovaně	43
Lymfocyty > 20x10 ⁹ /l	47
CD38+ izolovaně	61
ZAP-70+ a lymfocyty > 20x10 ⁹ /l	76
ZAP-70+ a CD38+	85
CD38+ a lymfocyty > 20x10 ⁹ /l	87
Všechny rizikové faktory	96

fludarabin versus fludarabin + cyklofosfamid (53) a britská podobné dvě větve a navíc chlorambucil v monoterapii (54, 55).

V americké studii se CR a ORR neukázala významně změněná ve vztahu vůči cytogenetickému nálezu nebo mutačnímu stavu. Mutační stav a ZAP-70 se dokonce neukázaly významné ve vztahu k PFS, byly ale asociovány s časem od diagnózy do progrese. PFS byl ale kratší u pacientů s 11q- a 17p- (53).

Britské nálezy jsou mírně odlišné. Nemocní se **17p-** byli častěji primárně rezistentní na léčbu. Důležitá byla ale hranice detekce těchto buněk, muselo jich být **nad 20 %**. Multivariantní analýza ukázala tyto 4 rizikové

Tab. 3. Stručný přehled dalších znaků sloužících k ohodnocení prognózy chronické lymfatické leukemie nebo majících silný vztah k této nemoci.

Znak	Metody, zkoumané parametry	Poznámka
Rozsah choroby	CT, ultrazvuk (UZ)	Překvapivě, CT/UZ vyšetření není standardní součástí klinické klasifikace ani hodnocení léčebné odpovědi. Některá data ukazují, že přetrvávající abdominální lymfadenopatie je negativní prognostický marker.
Minimální zbytková choroba	Měřeno pomocí PCR, ev. flowcytometrie	Dosažení negativity může být prognosticky příznivé
In vitro senzitivita na léky	Fludarabin, cyklofosfamid, chlorambucil	Korelace s léčebnou odpovědí
Měření kinetiky buněk	Inkorporace těžké vody	Horší prognóza při vyšší proliferativní aktivitě
Teloméry	Délka telomér	Kratší = horší prognóza
Lipoproteinová lipáza	Expresse měřena např. pomocí PCR	Vyšší exprese spojena s horší prognózou. Tento gen byl překvapivě objeven při studiích na DNA čipech, podobně jako ZAP-70, viz obr. 9
Angiogeneza	Denzita angiogeneze, endoglin, VEGF, bFGF, angiopoietin-2	Vyšší denzita cév, vyšší koncentrace VEGF korelují s horší prognózou. Studováno i českými autory (57)
Povrchové molekuly	HLA-G, CD49d, RHAMM/CD168	Vyšší exprese koreluje s horší prognózou
Cytokiny	IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, trombopoetin	Vyšší koncentrace koreluje s horší prognózou. Další cytokiny jsou studovány
Další markery	Polymorfismus P2X7 a promotoru bax genu; metylace TWIST2; mutace BCL-6; exprese ADAM29, SEPT10, Grb7, Tcl-1, FMNL-1	

faktory ukazující na pro krátký PFS: 17p- (> 20 %), nemutovaný IgV_H, 11q- a mužské pohlaví. Expres ZAP-70 byla významná, jen když se do modelu nezahrnul mutační stav. Expres CD38 byla významná pouze v univariální analýze. Autoři tak udávají **3 prognosticky rozdílné skupiny**: vysoké riziko: 17p- s PFS (3 roky) 20 %; standardní riziko (nemutovaný IgV_H nebo 11q-, nebo V_H3-21) s PFS (3 roky) 25 %; nízké riziko: mutovaný IgV_H (vyjma V_H3-21) s PFS (3 roky) 55 % (54, 55).

Byrd et al. (56) zjistili, že mutační stav a cytogenetický nálezn mají význam i pro předpověď PFS a celkového přežití po další moderní terapii, fludarabin + rituximab. Dosažení CR naproti tomu s těmito prognostickými znaky asociováno nebylo.

Další prognostické ukazatele

Výše uvedené moderní prognostické ukazatele zdaleka nejsou jediné, které existují. V poslední době přibýly publikace o významu dalších znaků. Jde ale často jen o abstrakta, nebo byly analýzy provedeny na malých souborech. Naproti tomu znaky výše uvedené jsou více prozkoumány a bylo jim již věnováno hodně prací. Přesto zde některé další znaky nebo markery, o nichž se diskutuje, pro informaci uvedeme (tab. 3).

Závěr

Moderní prognostické znaky se stávají součástí naší práce u nemocných s CLL. Přispěly také výrazně k pochopení patogeneze a patofyziologie CLL na molekulární úrovni. Přesto je nutné zdůraznit, že jejich definitivní role v naprosto běžné denní rutině zatím není zcela přesně definována a bude potřeba další rozsáhlý výzkum, než se tomu tak stane. Mnohá vyšetření jsou velmi specializovaná a drahá. Jiná nejsou všeobecně standardizovaná. To všechno jsou další úskalí, která mohou ztěžovat jejich interpretaci. Z těchto důvodů se jeví jako logické, aby vyšetřování nemocných a interpretace výsledků vyšetření vždy probíhaly v součinnosti s pracovišti, kde jsou s těmito novými metodami dostatečné zkušenosti.

Současnou situaci odráží i dvě renomované práce z poslední doby (58, 59). Binet et al. (58) jsou v používání nových prognostických markerů opatrnější, Zent et al. (59) je uvádějí jako standardní součást úvodního vyšetření nemocného.

Je nepochybné, že tyto znaky zde jsou a budou, že budou přibývat ještě další a jejich role se bude upřesňovat. Z tohoto důvodu je pochopení jejich objevení a významu zcela zásadní, i když zatím samy o sobě neopravňují k zahájení terapie u pacientů s CLL. Jejich pravidelné sledování ale přináší už nyní důležité informace pro lékaře, kteří nemocné s CLL léčí. Z tohoto důvodu je vhodné především nemocné mladšího věku dispenzarizovat v centrech, kde je komplexní diagnostika CLL prováděna.

Tato práce vznikla v rámci organizace Česká leukemická skupina - pro život, THE CZECH LEUKEMIA STUDY GROUP – FOR LIFE, CELL

Literatura

1. Gine E, Bosch F, Rozman M, et al. Fludarabine therapy abrogates the prognostic significance of bone marrow histological pattern in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 102: 673a, abstract No 2492.
2. Papajík T, Jarošová M, Pikalová Z, Indrák K. Chronická B-lymfocytární leukemie. Část II: Diagnostická kritéria a význam stanovení individuální prognózy nemocného. *Trans Hemat* dnes 2006; 12: 132-139.
3. Cmunť E, Trněný M, Karban J, Šálková J, Michalová K, et al. Analýza rizikových faktorů u 248 pacientů s chronickou B-lymfocytární leukemií vyšetřených v době diagnózy. *Trans Hemat* dnes 2006; 12: 232-239.
4. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-234.
5. Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, Charron D, D'Athys P, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer* 1977; 40: 855-864.
6. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
7. Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic factors and natural history. *Baill Clin Haematol* 1993; 6: 849-866.
8. Zwiebel JA, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol* 1998; 25: 42-59.
9. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-1916.
10. Jarošová M, Jedličková K, Holzerová M, Urbanová R, Papajík T, et al. Přínos metod molekulární cytogenetiky pro určení prognosticky významných chromozomových změn u nemocných s chronickou lymfatickou leukemií. *Čas Lék čes* 2000; 139: 564-569.
11. Michalová K, Zemanová Z, Cmunť E, Karban J, Březinová J, et al. Význam interfázické fluorescenční in situ hybridizace (I-FISH) pro vyšetření nemocných s chronickou lymfatickou leukemií (CLL). *Čas Lék čes* 2000; 139: 334-338.
12. Robak T, Dmoszynska A, Fetni R, Wang Y, Belkacem M, et al. Incidence of genomic aberrations and associated efficacy from a phase III study comparing alemtuzumab (Campath, Mabcampath) vs chlorambucil as first line therapy for B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 108: 593a, abstract No 2092.
13. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4634-4641.
14. Stilgenbauer S, Krober A, Busch R, et al. 17p deletion predicts for inferior overall survival after fludarabine – based first line therapy in chronic lymphocytic leukemia: first analysis of genetics in the CLL4 trial of the GCLLSG. *Blood* 2006; 106: 212a, abstract No 715.
15. Hillmen P, Skotnicki A, Robak T, Jaksic B, Sirard C, Mayer J. Alemtuzumab (Campath, Mabcampath) vs chlorambucil as front-line therapy for patients with progressive B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 108: 93a, abstract No 301.
16. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: study of

- 132 CLL cases with correlations to FISH, IgV_H status, and CD38 expression. *Blood* 2006; 108: 3152–3160.
17. **Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, et al.** Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 724–751.
 18. **Dreyer WJ, Bennet JC.** The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Nat Acad Sci USA* 1965; 54: 864–869.
 19. **Schroeder HW, Dighiero G.** The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994; 15: 288–294.
 20. **Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, et al.** Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102: 1515–1525.
 21. **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: 1848–1854.
 22. **Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, et al.** IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840–1847.
 23. **Kuhrová V, Francová H, Klimešová D, Brychtová Y, Doubek M, et al.** Molekulárně-genetická charakterizace agresivní chronické lymfocytární leukémie u českých pacientů: nukleotidová variabilita genů kódujících syntézu těžkého řetězce imunoglobulinů. *Čas Lék čes* 2006; 145: 855–858.
 24. **Lane BS, Mensah AA, Lin K, Pettitt AR, Sherrington PD.** Analysis of VH gene sequences using two web-based immunogenetics resources gives different results, but the affinity maturation status of chronic lymphocytic leukaemia clones as assessed from either of the resulting data sets has no prognostic significance. *Leukemia* 2005; 19: 741–749.
 25. **Davis ZA, Orchard JA, Corcoran MM, Oscier DG.** Divergence from the germ-line sequence in unmutated chronic lymphocytic leukemia is due to somatic mutation rather than polymorphism. *Blood* 2003; 102: 3075.
 26. **Hamblin TJ, Orchard JA, Davies ZA, et al.** How many somatic mutations should we allow the subset of chronic lymphocytic leukemia with unmutated IgV_H genes? *Blood* 2004; 104: 219a, abstract No 767.
 27. **Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, et al.** Somatic mutated IgV_H3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 2262–2264.
 28. **Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezzo P, Magnac C, et al.** Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3928–3932.
 29. **Moreno C, Villamor N, Colomer D, Esteve J, Gine E, et al.** Allogeneic stem cell transplantation may overcome the adverse prognosis of unmutated VH gene in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3433–3438.
 30. **Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Ferrero E, Malavasi F.** In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 108: 1135–1144.
 31. **Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, et al.** 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.
 32. **Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, et al.** CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 181–186.
 33. **Thornton PD, Fernandez C, Giustolisi GM, Morilla R, Atkinson S, et al.** CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol J* 2004; 5: 145–151.
 34. **Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, et al.** The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 2003; 101: 1262–1296.
 35. **Calissano C, Damle R, Benapour T, et al.** In vivo labeling of newly synthesized DNA suggest that the CD38+ fraction in enriched in proliferating cells within a clone of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2006; 108: 12a, abstract No 27.
 36. **Pospíšilová Š, Mayer J.** DNA čipy – moderní metodika analýzy diferenciální genové exprese a její význam pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění. *Čas Lék čes* 2005; 144: 11–17.
 37. **Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, et al.** Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639–1647.
 38. **Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, et al.** ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764–1765.
 39. **Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, 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: 4944–4951.
 40. **Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, et al.** 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: 839–901.
 41. **Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, et al.** ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; 363: 105–111.
 42. **Scielzo C, Camporeale A, Geuna M, Alessio M, Poggi A, et al.** ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cells subsets of different maturation stage. *Leukemia* 2006; 20: 689–695.
 43. **Trbušek M, Malčíková J, Šmardová J, Kuhrová V, Mentzlová D, et al.** Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia* 2006; 20: 1159–1161.
 44. **Carter A, Lin K, Sherrington PD, Atherton M, Pearson K, et al.** Imperfect correlation between p53 dysfunction and deletion of TP53 and ATM in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 737–740.
 45. **Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, et al.** Clinical, laboratory, and treatment outcome characteristics of chronic lymphocytic leukemia patients with p53 mutations or del (17p) enrolled on prospective phase III clinical trial: short progression free survival, irrespective of fludarabine-based treatment used. *Blood* 2004; 104: 272a, abstract No 949.
 46. **Austen B, Powel JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, et al.** Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of VGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005; 106: 3175–3182.
 47. **Štruncová S, Borská R, Kusenda B, Mejstřík P, Dvořáková D, Mayer J, Pospíšilová Š.** RNA interference – účinný nástroj regulace genové exprese. *Biol Listy* 2005; 70: 231–247.
 48. **Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, et al.** A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793–1801.
 49. **Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Buhler A, Seiler T, 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: 969–975.
 50. **Del Giudice I, Ghia EM, De Propriis SM, et al.** Chronic lymphocytic leukemia with discordance in ZAP-70 expression and IgVH mutation status. *Blood* 2006; 108: 789a, abstract No 2787.
 51. **Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, Capello D, Mancini F, et al.** Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and

- indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood* 2003; 102: 1035–1041.
52. **Gardiner A, Davis Z, Anton P, et al.** Defining the 10 year risk of the disease progression in stage A0 CLL. *Blood* 2006; 108: 785a, abstract No 2772.
 53. **Grever MR, Dewald GW, Neuberg DS, et al.** Select high risk genetic features predict earlier progression following chemotherapy in chronic lymphocytic leukemia: prospective randomized trial (Intergroup E2997) to evaluate justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 342a, abstract No 6521.
 54. **Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al.** Response to therapy and survival in CLL is influenced by genetic markers. Preliminary analysis from the LRF CLL4 trial. *Blood* 2004; 104: 8a, abstract No 13.
 55. **Oscier DG, Wade R, Orchard J, et al.** Prognostic factors in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2006; 108: 92a, abstract No 299.
 56. **Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, Grever MR, Lozanski G, et al.** Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 437–443.
 57. **Smolej L, Andrys C, Peková S, Schwarz J, Belada D, Žák P.** Plasma levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and their association with IgV_H mutation status in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematologica* 2006; 91: 1432–1433.
 58. **Binet JL, Caligaris-Capio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, et al.** Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 859–861.
 59. **Zent CS, Call TG, Hogan WJ, Shanafelt TD, Kay NE.** Update on risk – stratified management for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Lymphoma* 2006; 47: 1738–176.

Prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc.
Interní hematologická klinika
FN Brno Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: jmayer@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 14. 3. 2007
Přijato: 22. 6. 2007

VÝBĚR Z TISKU A ZPRÁVY O KNIHÁCH

A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study

Jan Astermark, Sharyne M. Donfield, Donna M. DiMichele et al. for the FENOC Study Group
Blood, 15 January 2007, Vol. 109, Number 2, pp. 546 – 551

Vznik inhibičních protilátek proti faktoru VIII je závažnou komplikací hemofilie. V léčbě pacientů s inhibitory se užívá aktivovaný koncentrát protrombinového komplexu, preparát FEIBA Baxter (faktor VIII inhibitory bypassing aktivita, aPCC) nebo rekombinantní faktor VII (rFVIIa, NovoSeven, Nordisk). Konečným cílem léčby je trvalá eradikace inhibitoru indukci imunotolerance (ITI), aby bylo možné léčit pacienty s inhibitory rutinní substituční terapií. U nemocných, kde se nedosáhne tohoto cíle, je výsledek nutných chirurgických zákroků a léčba krvácivých epizod nepředvídatelná a spojený s velkým rizikem. Pracovní skupina FENOC (FEIBA NovoSeven Comparative Study) vychází ze specializovaných pracovišť: Oddělení hematologie a chorob koagulace, Univerzitní nemocnice v Malmö, Švédsko, Oddělení biostatistiky, Rho, Chapel Hill, NC USA, Pediatrické oddělení, Weill Medical College, Cornell University, New York, USA a Angelo Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center, Univerzity v Miláně, Itálie). Skupina provedla prospektivní, otevřenou, randomizovanou, zkříženou studii, aby srovnala účinnost odpovědi na obě shora uvedené látky u nemocných s inhibitory a krvácením do kloubů (kotník, koleno, loket, rameno, kyčel). Parametry zájmu byla procenta nemocných s odpovědí na FEIBU ve srovnání s odpovědí na NovoSeven. Diference v procentech, která nebyla větší než 15 %, určovala klinicky přijatelné měřítko rovnocennosti účinku těchto dvou preparátů. Primární výsledek byl vyhodnocen za 6 hodin po zahájení léčby.

Analýzována byla data 96 krvácivých epizod u 48 účastníků studie. Každý účastník studie byl léčen jednou dávkou FEIBY (75 – 100 mg/kg tělesné hmotnosti: cílová dávka 85 mg/kg) nebo dvěma dávkami NovoSeven (90 – 120 mg/kg tělesné hmotnosti: cílová dávka 105 mg/kg x 2) podanými intravenózně, randomizovaným způsobem se zkříženou volbou pro následující krvácivou epizodu. Druhá dávka NovoSeven byla podána za 2 hod. po první dávce. Při zahájení byl průměrný věk 27,5 roků (8 – 55 let), průměrný titr inhibitoru byl 8,6 BU/ml (hranice 0 – 1 800 BU/ml). U žádného nebyla provedena indukce imunotolerance. Počet destiček a INR byly velmi podobné během léčebného období, stejně jako příčiny. Přibližně 85 % všech krvácivých epizod bylo spontánních, 15 % po traumatu. 27 párů (56,3 %) mělo krvácení do stejného kloubu. Distribuce

postižených kloubů byla rozdílná (P menší než 0,001). Výrony do kolenního kloubu byly častější ve skupině s NovoSeven (26 proti 15, tj. 54,2 % proti 31,3 %), výrony do loketního kloubu byly častější ve skupině s FEIBOU (21 proti 10, tj. 43,8 proti 20,8 %). Co se týká typu léčby a produktů během 6 měsíců před zařazením do studie, data byla k dispozici u 46 nemocných ze 48 pacientů zahrnutých do analýzy. 43 (93,5 %) nemocných dostávalo terapii „on demand“, 4,4 % (n = 2) bylo na profylaktické léčbě a jeden nemocný měl oba tyto typy léčby. 55% pacientů celé skupiny bylo již vystaveno podávání jak FEIBY tak NovoSeven, 17,4 % mělo jen FEIBU a 23,9 % jen NovoSeven. Čtyři nemocní (8,7%) nedostali žádný z těchto produktů během 6 měsíců před zařazením do studie. Celá studie byla podrobena podrobné statistické analýze a diskusi výsledků jak z hlediska charakteristiky skupiny, tak vyhodnocení hemostatického efektu, doby zastavení krvácení a počtu infuzí potřebných k zastavení krvácení.

Při použití FEIBY dostali pacienti v průměru 13 infuzí (medián, pásmo 1–4), při použití NovoSeven v průměru 2,4 infuze (medián, pásmo 1–8). Přídavné dávky byly podány, když režim podle protokolu nebyl dostačující. Doba do přídavných dávek byla různá. U malé skupiny (n = 2) to bylo během 6 hodin po začátku léčby, u zbytku v průběhu 48 hodin. Autoři uzavírají studii jako první randomizovanou studii zaměřenou na vyhodnocení a srovnání účinnosti aPCC a rFVIIa, protože dosud taková studie 2 produktů nebyla provedena. Účinek FEIBY a NovoSeven na kloubní krvácení se jim jeví jako podobný, ačkoliv účinnost mezi produkty je hodnocena různě během prvních 12 hodin od začátku příznaků u značné části nemocných. Toto období je velmi důležité, protože časná zástava krvácení může být velmi důležitá v rámci prevence destrukce kloubní chrupavky. Z patofyziologického a farmakologického pohledu je potřeba rozdíly v odpovědi mezi jedinci vysvětlit dalšími studiemi (včetně měření in vitro k určení a predikci efektu in vivo, aby byl dosažen i vyšší stupeň účinnosti, než je dokládáno v této FENOC studii). Je také třeba vypracovat zlepšené léčebné protokoly a algoritmy pro pacienty, kteří na léčbu neodpovídají.

Prof. MUDr. Otto Hrodek, DrSc.
FN Motol Praha