

Hodnotenie odpovede na liečbu u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou liečených s inhibítormi tyrozínkinázy

RNDr. Miroslava Eckertová, PhD., Mgr. Alena Žákovičová, RNDr. Renáta Lukačková

Medirex, a. s., člen skupiny **MEDIREX GROUP**, Bratislava

Pokroky v liečbe chronickej myelocytovej leukémie (CML) sa výrazne zmenili s príchodom inhibítorov tyrozínkinázy (TKI). Absolútnou nevyhnutnosťou liečby je pravidelná aktualizácia manažmentu pacientov a liečebných odporúčaní. Aktuálne odporúčania podľa European LeukemiaNet (ELN) sú z roku 2013, ktoré predstavujú tretiu verziu odporúčení liečby CML z roku 2006 a 2009.

Kľúčové slová: chronická myelocytová leukémia, inhibítory tyrozínkinázy, hodnotenie odpovede na liečbu

Treatment response assessment of patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors

Advances in chronic myeloid leukemia treatment have markedly changed with the introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKI). Absolute must is regular updating of patients management and treatment recommendations. Current recommendations in accordance to European LeukemiaNet (ELN) are from 2013, which presenting the third version of recommendations for the management of CML in 2006 and 2009.

Key words: chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, treatment response assessment

NewsLab, 2016; roč. 7(1): 30–33

Úvod

Chronická myelocytová leukémia (CML) je klonálna porucha hematopoetickej kmeňovej bunky s diferenciáciou prevažne do myeloidného radu. Typickým cytogenetickým nálezom je prítomnosť tzv. chromozómu Philadelphia (Ph), ktorý je výsledkom recipročnej translokácie medzi dlhými ramenami chromozómov 9 a 22, t(9;22)(q34;q11), ktorá je identifikovateľná u viac ako 95 % chorých s CML. Produktom tejto translokácie je fúzny gén *BCR-ABL*, ktorý kóduje chimérické proteíny (p190, p210, p230). Najčastejšie sa vyskytujúcim z nich je proteín p210 s konštitutívnou aktivitou tyrozínkinázy (TK). Jeho podiel na patogenéze CML a výslednom leukemickom fenotype sa v súčasnosti považuje za kľúčový (1). Približne u 5 % pacientov s CML nie je možné dokázať Ph chromozóm, ale majú dokázaný fúzny gén *BCR-ABL*. Ochorenie sa označuje ako CML Ph negatívna, *BCR-ABL* pozitívna (Ph-, *BCR-ABL*+).

Chronická myelocytová leukémia tvorí približne 15 – 20 % zo všetkých prípadov leukémií dospelých s incidenciou 1 – 1,5 prípadu/100 000 obyvateľov za rok. Ochorenie sa vyskytuje vo všetkých vekových skupinách, ale výskyt pomaly narastá s vekom. Medián veku v čase diagnózy sa uvádza 61 rokov, v klinických štúdiách dokonca iba 58 rokov. Muži sú o niečo častejšie postihnutí ako ženy (1,4 : 1).

Hoci k základným vyšetreniam na dôkaz ochorenia CML zaraďujeme fyzikálne vyšetrenia a vyšetrenia krvného obrazu, cytogenetické a molekulové vyšetrenie je kľúčové na potvrdenie diagnózy. Významný je predovšetkým dôkaz onkogénu *BCR-ABL*, ktorý kóduje už spomenutý fosfoproteín s tyrozínkinázovou aktivitou. Cieľom liečby CML je dosiahnuť kompletnú molekulovú remisiu, t. j. stav, keď nie je možné detegovať ochorenie ani na molekulovej úrovni.

Ciele a možnosti liečby CML

Hlavnú skupinu liekov, ktorými sa liečia pacienti s CML v súčasnosti, predstavujú inhibítory tyrozínovej kinázy (TKI), ktorých zavedenie do liečby znamenalo revolúciu v liečbe CML. Imatinib mesylát (IM) je považovaný za liek prvej línie u chorých s novodiagnostikovanou CML v chronickej fáze ochorenia a cieľom liečby je dosiahnutie veľkej molekulovej odpovede (MMR). Dosiahnutie MMR do 1 roka sa považuje za významný prediktor hlbokéj molekulovej odpovede.

S cieľom zvýšenia počtu odpovedí, ale aj prekonania rezistencie na imatinib sa začal vývoj nových TKI. V skutočnosti tieto lieky dokázali rýchlejšie navodenie vyššieho počtu cytogenetických a molekulových remisií. S týmito cieľmi boli vyvinuté dve nové TKI (dasatinib a nilotinib), t. j. druhogeneračné TKI.

Aj napriek produkcii signifikantne vysokého počtu liečebných odpovedí pri CML, približne u 25 – 30 % pacientov sa vyvinie rezistencia na liečbu. Jej najčastejšou príčinou je vznik alebo nárast mutácií v *BCR-ABL* kinázovej doméne, ktorá je aj najčastejšie uvádzanou príčinou získanej rezistencie na imatinib. Mutácia T315I predstavuje významný klinický problém, pretože je rezistentná k všetkým komerčne dostupným TKI 1. a 2. generácie. Mutácia je spojená s vysokoagresívnym priebehom ochorenia a zlou prognózou, ak nedôjde k rýchlemu terapeutickému zásahu a zmene terapie (ponatinib, danusertib).

Alogénna transplantácia kmeňových krvotvorných buniek je stále považovaná za jedinou dokázateľnú možnosť eradikácie malígneho klonu. V súčasnosti je posunutá do 3. a 4. línie liečby po zlyhaní druholíniových TKI. Indikovaná je pacientom, ktorí sú rezistentní na liečbu alebo majú intoleranciu aspoň k jednému z TKI 2. generácie.

Tabuľka 1. Odporúčené vyšetrovacie metódy a ich časové intervaly podľa ELN 2013

V čase diagnózy	■ CBA z kostnej drene; ■ FISH v prípade Ph negativity, ťažko hodnotiteľnej morfológie chromozómov a na odhalenie kryptickej translokácie; ■ kvalitatívna PCR (identifikácia typu zlomu)
Počas liečby	■ qRT-PCR na určenie hladiny transkriptov, BCR-ABL podľa IS v 3-mesačných intervaloch do dosiahnutia MMR, potom každých 3 – 6 mesiacov a/alebo ■ CBA v bunkách KD (≥ 20) v mesiacoch 3., 6. a 12. do dosiahnutia CCyR, potom každých 12 mesiacov; ■ po dosiahnutí CCyR postačuje FISH analýza (PK)
Zlyhanie liečby, progresia	■ qRT-PCR, mutačná analýza a CBA metafáz v bunkách KD
Varovné znaky	■ molekulové a cytogenetické vyšetrenia (CBA) realizovať častejšie v bunkách KD

Vysvetlivky: CBA – chromosome banding analysis; klasické cytogenetické vyšetrenie kostnej drene, analyzuje sa 20 metafáz

V rámci projektu medzinárodnej spoločnosti pre diagnostiku a liečbu CML ELN (European LeukemiaNet) vznikol projekt EUTOS for CML (The European Treatment Outcome Study for CML), do ktorého sú od roku 2009 zaradovaní aj pacienti z Českej a Slovenskej republiky. Ide o register CAMELIA a INFINITY.

V článku prinášame ELN odporúčania pre manažment pacientov s CML z roku 2013 (2), ktoré sú treťou verziou odporúčení z roku 2006 (3) a 2009 (4).

Cytogenetické vyšetrenie

Cytogenetické vyšetrenie je esenciálne na potvrdenie diagnózy CML a monitorovanie cytogenetickej remisie ochorenia.

Ph pozitívna CML. V čase diagnózy má 95 % pacientov s CML v aspiráte kostnej drene prítomný Ph chromozóm. Asi u 5 – 10 % Ph pozitívnych pacientov Ph chromozóm vznikne variantnou komplexnou translokáciou, do ktorej je zapojených tri a viac chromozómov.

Ph negatívna CML. Približne 5 % pacientov s CML nemá prítomný Ph chromozóm, ale je prítomná génová fúzia *BCR-ABL*. Ide o kryptickú translokáciu t(9;22), ktorá je cytogeneticky nedetegovateľná. Patologický klon je Ph negatívny (Ph-) a zároveň *BCR-ABL* pozitívny.

Okrem translokácie t(9;22) sa môžu vyskytnúť aj prídavné cytogenetické zmeny, ktoré sú zväčša predzvesťou progresie ochorenia. Delécia 9. chromozómu a variantné translokácie nemajú prognostický význam (5),

avšak klonálne chromozómové aberácie (CCA) v Ph+ bunkách (CCA/Ph+) majú negatívnu prognostickú hodnotu, hlavne v prítomnosti tzv. „major zmien“, ako sú duplikácia Ph chromozómu (+Ph); izochromozóm 17q; trizómia 8; trizómia 19 a 21, ale aj strata chromozómu 17p (6, 7).

Cytogenetické vyšetrenie z kostnej drene (CBA – chromosome banding analysis) sa podľa ELN kritérií vykonáva v čase diagnózy a/alebo pri monitorovaní odpovede pacienta na liečbu v 3., 6. a 12. mesiaci liečby až do dosiahnutia kompletnej cytogenetickej remisie (CCyR), následne každých 12 mesiacov. CBA sa vykonáva aj v progresii ochorenia počas liečby, pri zlyhaní liečby, v prípade výskytu myelodysplázie alebo prídavných aberácií v Ph negatívnom klone. Pri výskyte varovných znakov ELN odporúča vyšetriť karyotyp častejšie spolu s molekulovým vyšetrením (tabuľka 1).

FISH (fluorescenčná *in situ* hybridizácia)

FISH metóda patrí medzi molekulovo-cytogenetické metódy, ktoré umožňuje detegovať aj submikroskopické zmeny chromozómov, čo v prípade CML znamená napríklad identifikáciu kryptickej translokácie u Ph negatívnych pacientov, stanovenie typu translokácie a identifikáciu mikrodélécií. Zároveň je FISH vyšetrenie schopné identifikovať patologický klon aj v nízkom percentuálnom zastúpení. Cieľom FISH vyšetrenia je stanoviť percentuálne zastúpenie patologického klonu s t(9;22) vo vyšetrovanej populácii buniek (tabuľka 2 a 3).

FISH vyšetrenie z kostnej drene (KD) sa vykonáva v čase diagnózy, keď sa určí typ translokácie. FISH vyšetrenie je nápomocné najmä vtedy, ak ide o Ph negatívnu CML (potvrdenie kryptickej translokácie), alebo ak cytogenetické vyšetrenie nie je možné uskutočniť. Následne sa FISH vykonáva pravidelne až do dosiahnutia kompletnej cytogenetickej remisie (CCyR), potom každých 12 mesiacov (tabuľka 1).

Molekulová analýza

Minimálna reziduálna choroba, počet transkriptov *BCR-ABL*, sa sleduje metódou molekulovej analýzy, kvantitatívnou polymerázovou reťazovou reakciou v reálnom čase (qRT-PCR). Molekulovú odpoveď stanovujeme na základe hodnotenia pomeru *BCR-ABL* ku konkrétnemu génu, najčastejšie *ABL* v % podľa medzinárodnej stupnice IS (International Scale). Zároveň je nutné poznamenať, že počty kópií kontrolného génu *ABL* v replikátoch musia mať hodnoty $> 10\,000$. Stupnica IS bola vyhotovená na to, aby sa mohli jednotlivé *BCR-ABL* hodnoty získané v rôznych laboratóriách navzájom zosúladiť – pomocou špecifických konverzných faktorov pre dané laboratórium.

Tabuľka 2. Hodnotenie odpovede na liečbu u pacientov s CML liečených TKI v 1. línii v jednotlivých časových intervaloch

Čas začiatku liečby	Optimálna odpoveď	Varovné znaky	Zlyhanie liečby
3 mesiace	$BCR-ABL \leq 10\%$ a/alebo Ph+ $\leq 35\%$	$BCR-ABL > 10\%$ a/alebo Ph+ 36 – 95 %	Nedosiahnutie CHR a/alebo Ph+ $> 95\%$
6 mesiacov	$BCR-ABL \leq 1\%$ a/alebo Ph+ 0 (CCyR)	$BCR-ABL > 1 - 10\%$ a/alebo Ph+ 1 – 35 %	$BCR-ABL > 10\%$ a/alebo Ph+ $> 35\%$
12 mesiacov	$BCR-ABL \leq 0,1\%$ (MMR)	$BCR-ABL 0,1 - 1\%$	$BCR-ABL > 1\%$ a/alebo Ph+ $> 0\%$
Následne kedykoľvek v priebehu liečby	$BCR-ABL \leq 0,1\%$ (MMR)	CCA/Ph- (-7 alebo 7q-)	Strata CHR Strata CCyR Potvrdená strata MMR Mutácie CCA/Ph+

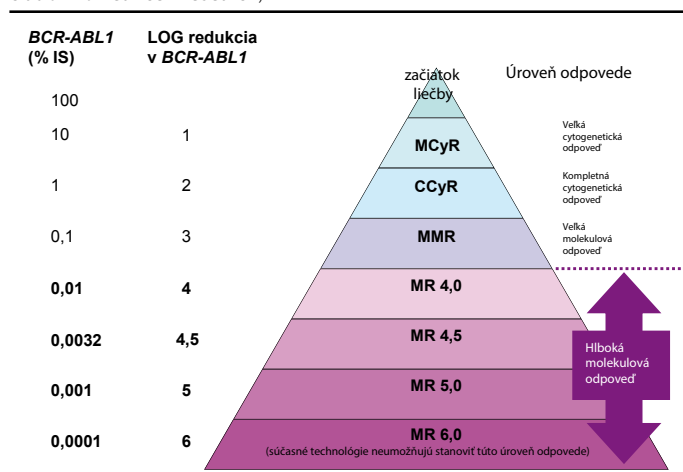
Vysvetlivky: CHR – kompletná hematologická odpoveď: normálny diferenciál, leukocyty, trombocyty v norme, CCA/Ph+ – klonálne chromozomálne abnormality v Ph+, CCA/Ph- – klonálne chromozomálne abnormality v Ph-

Tabuľka 3. Hodnotenie odpovede na liečbu u pacientov s CML liečených TKI v 2. línii liečby, po zlyhaní liečby s imatinibom

Čas Začatie liečby	Optimálna odpoveď	Varovné znaky	Zlyhanie liečby
3 mesiace	$BCR-ABL \leq 10\%$ a/alebo $Ph+ \leq 65\%$	$BCR-ABL > 10\%$ a/alebo $Ph+ 65 - 95\%$	Nedostiahnutie CHR alebo $Ph+ > 95\%$ alebo nové mutácie
6 mesiacov	$BCR-ABL \leq 10\%$ a/alebo $Ph < 35\%$ (PCyR)	$BCR-ABL \leq 10\%$ a/alebo $Ph+ 35 - 65\%$	$BCR-ABL > 10\%$ a/alebo $Ph+ > 65\%$ a/alebo nové mutácie
12 mesiacov	$BCR-ABL < 1\%$ a/alebo $Ph+ 0$	$BCR-ABL 1 - 10\%$ a/alebo $Ph+ 1 - 35\%$	$BCR-ABL > 10\%$ a/alebo $Ph+ > 35\%$ a/alebo nové mutácie
Následne kedykoľvek v priebehu liečby	$BCR-ABL \leq 0,1\%$ (MMR) a/alebo lepšia odpoveď	CCA/Ph- (-7 alebo 7q-) alebo $BCR-ABL > 0,1\%$	Strata CHR Strata CCyR, alebo PCyR Nové mutácie Potvrdená strata MMR CCA/Ph+

Vysvetlivky: CHR – kompletná hematologická odpoveď: normálny diferenciál, leukocyty, trombocyty v norme, CCA/Ph+ – klonálne chromozomálne abnormality v Ph+, CCA/Ph- – klonálne chromozomálne abnormality v Ph-

Obrázok. Typy a definície odpovedí na liečbu CML (2013 American Association for Cancer Research)



IS je založená na dvoch definovaných hodnotách:

- štandardizovaná „baseline/východisková“ hodnota, ktorá je definovaná mediánom hladiny *BCR-ABL* vo včasnej chronickej fáze CML pred liečbou (IS – 100 %),
- zníženie o 3 log (1 000-násobne) proti bazálnej hodnote (IS – 0,1 %) zodpovedá veľkej molekulovej odpovedi (MMR) (8, 9).

Úrovně molekulovej odpovede pri liečbe CML sú uvedené na obrázku a hodnotenia odpovedí na liečbu u pacientov s CML liečených prvo- a druhoгенераčnými TKI sú uvedené v tabuľke 2 a 3. V súčasnosti sa kladú sprísnené kritériá na monitorovanie hlbokaj molekularnej odpovede, keďže trvalá hlboká molekularna odpoveď je nevyhnutným vstupným kritériom v klinických skúšaniach, ktoré skúmajú možnosť dosiahnutia remisie bez liečby.

Predanalytické informácie

Na cytogenetické a FISH vyšetrenie sa odoberá 5 ml periférnej krvi (PK) alebo kostnej drene (KD) do skúmaviek s heparínom lítym (LiH).

Na molekulové vyšetrenie sa odoberá 5 ml PK alebo KD do skúmaviek s EDTA a zároveň 3 ml PK alebo KD do TEMPUS skúmaviek, ktoré obsahujú stabilizačný roztok zamedzujúci degradáciu RNA. Vzorky sa do transportu a počas neho uchovávajú pri teplote 4 – 10 °C, pričom je potrebné, aby boli vzorky doručené do laboratória čo najskôr.

Literatúra

1. Cortes JE, Nicolini FE, Wetzler M, et al. Subcutaneous omacetaxine mepesuccinate in chronic or accelerated chronic myeloid leukemia resistant to two or more tyrosine-kinase inhibitors including imatinib. *Blood*. 2011;118:abstract 3761.
2. Baccarani M, Deininger M, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872–884.
3. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. European LeukemiaNet. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108(6):1809–1820.
4. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):6041–6051.
5. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, et al. Schweizerische Arbeitsgemeinschaft für Klinische Krebsforschung (SAKK) and the German Study Group. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*. 2011;118(26):6760–6768.
6. Katarjian HM, Shah NP, Cortes JE, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia: 2-years follow up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*. 2012;119(5):1123–1129.
7. Faber E, Muzik J, Koza V, et al. Treatment of consecutive patients with chronic myeloid leukemia in the cooperating centres from the Czech Republic and the whole of Slovakia after 2000 – a report from the population-based CAMELIA Registry. *Eur J Haematol*. 2012;87(2):157–168.
8. Branford S, Hughes T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. *Methods Mol Med*. 2008;125:69–92.
9. Branford S. Monitoring after successful therapy for chronic myeloid leukemia. *Hematology 2012, ASH*. 2012;105–110.

RNDr. Miroslava Eckertová, PhD.
Medirex, a. s., člen skupiny **MEDIREX GROUP**
Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
miroslava.eckertova@medirex.sk

Indikačné obmedzenia

VŠZP a UNION				
Kód výkonu	Názov výkonu	Indikujúci lekár	Frekvencia	
4977	Analýza chromozómov buniek kostnej drene, leukemickej periférnej krvi konvenčnou metódou vrátane kultivácie alebo dlhodobej subkultivácie. Priame spracovanie dvoch vzoriek alebo založenie dvoch paralelných kultúr. Kultivácia suspenzie 24 až 120 hodín. Zhotovenie a konvenčné farbenie preparátov. Zhodnotenie potrebného počtu mitóz priamou mikroskopiou. V prípade potreby zhotovenie obrazovej dokumentácie. Za každé vyšetrenie.	001; 019; 031; 062; 329	bez obmedzenia	
4978	Použitie metód diferenciačného farbenia chromozómov vrátane potrebnej fotodokumentácie, dodatok k výkonom pod kódmi 4972, 4975, 4976 a 4977. Zafarbenie preparátov metódami diferenciačného farbenia chromozómov, napríklad: C prúžkovanie, G prúžkovanie. Zhodnotenie potrebného počtu mitóz priamou mikroskopiou. V prípade potreby zhotovenie obrazovej dokumentácie. Za každú metódu.	001; 019; 031; 062; 329	bez obmedzenia	
4986a	FISH – fluorescenčná in situ hybridizácia	001; 019; 031; 062; 329	bez obmedzenia	
4982	Izolácia RNA, prepis do cDNA pomocou reverznej transkriptázy a primerov, dlhodobé uchovávanie vzorky. Za každú vzorku	001; 004; 019; 031; 062; 104; 329	bez obmedzenia	
4993	Kvantitatívna RT – polymerázová reťazová reakcia, za jednu RNA vzorku.	001; 002; 003; 004; 009; 029; 031; 040; 048; 062; 063; 104; 140; 154; 156; 163; 329; 331	bez obmedzenia	
Dôvera				
Kód výkonu	Názov výkonu	Určené pre diagnózy	Indikujúci lekár	Frekvencia
7218A	CML prvovýšetrenie, CG + FISH + MG	C92.1, C93.1	031; 329; 342	1-krát za život
7218B	CML relaps, CG + FISH + MG	C92.1, C93.2	031; 329; 342	
7218C	CML kontrolné vyšetrenie, CG alebo FISH	C92.1, C93.3	031; 329; 342	*1-krát/3 mesiace
7218D	CML kontrolné vyšetrenie, MG	C92.1, C93.3	031; 329; 342	1-krát/3 mesiace
*prvý rok od zistenia dg. 1 x /3 mesiace a potom pri dosiahnutí MMR len 1-krát /rok podľa ELN 2013				
Vysvetlivky: CG – cytogenetické vyšetrenie, MG – molekulové vyšetrenie				