

## **Lymfómové fórum 2007**

**V januári 2007 vyšlo prvé vydanie konsenzu o modernej „Stratégii liečby malígnych lymfómov“. Kolektív špičkových slovenských odborníkov v onkológii, hematológii a patológii krvných malignít, združených v Lymfómovej skupine SR, v nej podáva ucelenú informáciu o klasifikácii, diagnostike aj liečbe malígnych lymfómov. Podobne ako vydanie tejto publikácie, aj tohtoročné Lymfómové fórum 2007 by sa neuskutočnilo bez významnej pomoci spoločnosti Roche Slovensko, s.r.o.**

Lymfómová skupina SR existuje už 4 roky a tento rok oslávilo prvý rok existencie aj rovnomenné občianske združenie. Ročník 2007 Lymfómového fóra, ktorý sa konal v dňoch 9. – 11. februára 2007 vo veľmi peknom prostredí hotela Kaskády v Sielnici, rozoberal do detailov súčasnú diagnostiku a modernú liečbu folikulového lymfómu. Ide o druhý najčastejší NHL (22 %) hneď po difúznom veľkobunkovom lymfóme (34 %).

### **Biologická charakteristika a bioptická diagnostika folikulového lymfómu**

Prvý blok prednášok sa tématicky zamerail na staré a nové informácie z oblasti histopatologickej, prietokovo - cytometrickej a cytogenetickej diagnostiky folikulového lymfómu. Chairmanami tohto bloku boli **primár MUDr. J. Hudeček** a **prof. MUDr. L. Plank, PhD.**

V onkológii sa prognóza ochorenia alebo úspešnosť liečby malígneho ochorenia vždy odráža od správnej, adekvátne rýchlej a čo možno najpresnejšej patologickej diagnózy. Pri folikulovom lymfóme, podobne ako pri niektorých ďalších malignitách z tejto skupiny platí, že histopatologický grading nezodpovedá celkom presne biologickým charakteristikám ani prognóze lymfómu. Touto praktickou dilemou sa zaoberala aj prvá prednáška **prof. MUDr. L. Planka, PhD (JLF UK a MFN v Martine)**. Martinské pracovisko patrí v súčasnosti k špičke v bioptickej diagnostike malígnych ochorení krvotvorby na Slovensku. Aj preto asi prvá prednáška Lymfómového fóra 2007 patrila ich pohľadu na problémy a novinky v histopatologickej diagnostike

folikulového lymfómu. Na začiatku prednášky veľmi stručne charakterizoval epidemiologický význam tejto malignity pre našu populáciu aj zdravotný systém. Folikulový lymfóm, ktorý je jasne definovaný v klasifikácii malígnych lymfómov podľa SZO 2001, je druhý najčastejšie sa vyskytujúci typ NHL-B v našej a aj svetovej populácii. V Európe predstavuje asi 22 % z celkového počtu NHL, v USA je tento podiel o niečo vyšší. **Vyskytuje sa typicky u starších dospelých a veľmi zriedkavo aj u detí alebo mladších dospelých (vek < 20 rokov). Medián výskytu je vo veku 59 rokov. Podľa dostupných národných štatistík o výskyte tohto typu lymfómu v SR (najrecentnejšie dáta, ktoré udával prof. Plank sú z roku 2001) sa zdá, že incidencia FL u mužov aj u žien na Slovensku stúpa už od roku 1994, výraznejšie v posledných rokoch, pričom nárast incidencie sa nedá pripísať len zlepšeniu diagnostiky.** Malígny klon vychádza z B-buniek germinatívnych centier lymfatických folikulov. Folikulový lymfóm má veľmi jasne definovaný fenotyp (CD20+, CD10+, BCL-6 proteín+, BCL-2 proteín+) a tiež genotyp t(14;18). Translokáciu t(14;18) má 85 % - 90 % pacientov. Táto genetická mutácia sa považuje za základný cytogenetický diagnostický marker folikulového lymfómu. Aj keď ide o veľmi typickú translokáciu, nie je prítomná u všetkých pacientov, a teda nie je *conditio sine qua non*. Folikulový lymfóm (FL) sa najčastejšie vyskytuje ako tzv. **nodálny typ**, s typickým primárnym postihnutím lymfatických uzlín (LU) a väčšinou v čase diagnózy je postihnutá aj slezina a často už aj kostná dreň, prípadne Waldeyerov - Pirogovov lymfatický okruh. Veľmi zriedkavou formou sú **extranodálne typy FL**, z ktorých si osobitú pozornosť z hľadiska biologického správania podľa prof. Planka zasluhuje **črevný a kožný typ FL**. Čo sa týka biologických vlastností a kuratívnosti, FL sa považuje v naprostej väčšine prípadov za nevyliciteľný indolentný lymfóm, ktorý má aj jasne definovaný medián prežívania. Klinické skúsenosti napriek tomu svedčia o značne heterogénnom priebehu aj o rozdielnej prognóze u jednotlivých pacientov. Na tom nič nemení skutočnosť, že približne v 30 % dochádza k

malígnej transformácii, najmä do malígneho veľkobunkového lymfómu (vtedy zmeny p53, p16, c-myc, apod.). Pre patológov nie problém tento typ NHL diagnostikovať, nakoľko ochorenie má okrem už spomínanej translokácie t(14;18) aj niekoľko zásadných diagnostických fenotypických znakov. Existuje však podskupina pacientov s FL, u ktorých sa typická translokácia t(14;18) nenájde, ale nájdu sa iné špecifické génové abnormality (gén bcl-2 na chromozóme 18, gén IgH na chromozóme 14, Bcl-2/IgH, zlom Mbr, bcl-2/IgH, zlom Mer, CD21 FDCs, apod.). Mutácia bcl-2 blokuje apoptózu, vďaka čomu sa malígný klon CD20+ lymfocytov stáva nesmrteľným a ochorenie indolentným. **Z pohľadu patológa je dôležité, aby sa nádorové markery CD10 a Bcl-6 proteín diagnostikovali nielen vnútri neoplastických folikulov, ale aj v interfolikulových blastoch. Typické translokačné mechanizmy t(14;18) sa dnes považujú za spúšťač ochorenia, ale nadmerná expresia Bcl-2 proteínu je možná aj pri chýbaní tejto klasickej translokácie, resp. existujú FL, pri ktorých táto translokácia chýba, ale je prítomná iná translokácia génu Bcl-6 – napr. t(3;14).** Počas progresie FL dochádza ku klonálnej evolúcii a ďalšej genetickej alterácii v klone (zisky +X,+7,+12 alebo 12q13-14, 18 alebo straty del6q, del13q,1p36-, 17p13-, del10q22-24). Z hľadiska akademického je podľa prof. Planka zaujímavé, či tieto genetické zmeny sú v malígnom klone buniek zakódované už od začiatku, alebo ide skutočne o sekundárne zmeny, navodené rastúcou nádorovou masou a zmenenými požiadavkami pre metabolizmus buniek. **Na rozdiel od histopatologickej diagnózy nie je histopatologický grading pri folikulovom lymfóme vôbec ľahkou záležitosťou, aj keď niektorí patológovia sa optimisticky domnievajú, že určiť grading FL nie je problém.** Podľa histopatologických kritérií sa FL delí na lymfóm s nízkym a vysokým stupňom malignity, pričom kritériá delenia, ktoré stanovujú hranice medzi týmito dvomi rozdielne sa biologicky chovajúcimi typmi FL sú čisto empirické, konštatoval prof. Plank. Podľa konsenzu amerických patológov, ktorý sa opiera o výsledky niekoľkých neštandardizovaných štúdií sa stanovilo,

že ak sa v istom štandardnom počte definovaných veľkých zorných polí nájde viac ako 15 centroblastov ( $>15$  cb/hpf), ide o G3, teda o vysoko malígnu FL. Ak sú počty centroblastov nižšie, ide o G1 (0-6 centroblastov/hpf) alebo G2 (6-15 centroblastov/hpf). Toto delenie však situáciu len komplikuje a podľa prof. Planka by úplne stačilo rozdelenie na dva gradiny – FL s vysokým stupňom malignity a FL s nízkym stupňom malignity. Existujú totiž prípady FL, ktoré spĺňajú histopatologické kritériá čo sa týka počtu cb/hpf, ktoré ho zaraďujú do G2, ale obsahujú navyše aj veľké centrocyty, „vďaka“ čomu ich niektorí patológovia môžu nadhodnotiť a mylne zaradiť medzi FL s vysokým stupňom malignity. FL s vysokým stupňom malignity sa delí ešte na dve menšie podskupiny: G3a a G3b. **Grading G3a má na reze typickú zmes centroblastov a centrocytov. Existuje predpoklad, že ide o terminálne štádium predtým indolentného FL, teda vlastne o progresiu ochorenia z benígneho do vysoko malígneho. Translokácia t(14;18) sa v tomto štádiu vyskytuje vo viac ako 90 % prípadov. G3b FL je nádor, ktorý je zložený výlučne z centroblastov a uvažuje sa, že ide o primárny, de novo vznikajúci nádor a z tohto hľadiska je zaujímavé, že len polovica pacientov s primárnym FL G3b nesie typickú translokáciu t(14;18), zatiaľ čo druhá polovica pacientov má v malígnom klone iné cytogenetické znaky, ktoré ho približujú inému lymfómu – tzv. difúznemu veľkobunkovému lymfómu (DLCL). Tieto pozorovania preto indukujú viaceré otázky. Do akej miery je FL G3a skutočne len sekundárnym FL, ktorý vznikol transformáciou benígneho FL? Nie je FL G3b a tzv. GC typ DLCL vlastne tým istým typom nádoru, ktorý vznikol osídľovaním predtým vytvorených folikulov blastami DLBCL a tým vytvára dojem folikulového rastu? (Ott a kol., 2003). Tým sa prof. Plank postupne dostal aj k otázke pôvodu vzniku FL. Súčasná poznatky vedú čoraz viac patológov k presvedčeniu, že doterajšia predstava o vzniku FL následkom zmien lymfocytov vnútri germinálneho centra, nie je správna. **Translokácia t(14;18)(q32, q21), ktorá sa v súčasnosti považuje za včasný iniciačný faktor****

vo vývoji FL, sa totiž dokázala v kostnej dreni aj v periférnej krvi u istého počtu biologicky úplne zdravých jedincov. Dnes prevláda názor, že tieto bunky, tzv. **naivné B-lymfocyty t(14;18) s nadmernou expresiou Bcl-2**, sa dostávajú do zárodočného centra lymfatického folikulu, kde podliehajú vplyvom zárodočného centra a následnej transformácii tak ako ostatné imunokompetentné bunky. Dochádza k opakovaným cyklom proliferácie pričom môže dôjsť k rôznorodej klonálnej evolúcii karyotypu. V najhoršom prípade dochádza k expanzii klonu DLCL alebo k vzniku primárne indolentného FL, ktorý sa v dôsledku sekundárnych genetických zmien môže o ničo neskôr transformovať na sekundárny DLCL. Nález **naivných B-lymfocytov t(14;18) s nadmernou expresiou Bcl-2 v periférnej krvi sa preto dá považovať za prekancerózu v evolúcii FL. Translokácia t(14;18), ktorá sa nájde v lymfocytoch z periférnej krvi u zdravých jedincov sa môže už dnes považovať za potenciálny včasný biomarker pre vznik folikulového lymfómu** (Roulland a kol., 2003). Okrem tejto prekancerózy patológia rozpoznáva aj ďalšie štádium vo vývoji FL, a to tzv. **folikulárny lymfóm in situ**. Malígny klon s nadmernou expresiou Bcl-2 je lokalizovaný vo vnútri normálnej populácie navonok reaktívne vyzerajúceho lymfatického folikulu. FL in situ sa však v súčasnosti dá identifikovať len s pomocou špičkových techník (laser capture dissection) (Cong a kol., Blood, 2002). V súčasnosti sa dokázala vyššia frekvencia niektorých špecifických genetických zmien aj u transformovaného FL (sekundárny DLBCL z FL), ktoré sú alebo môžu byť predzvest'ou transformácie FL na vysoko malígnu formu. Ide najmä o tzv. p38-mitogénovú aktivovanú proteínovú kinázu (MAPK). Gény pre MAPK sa v zvýšenej miere dokázali u tých FL, ktoré majú tendenciu malígne sa transformovať. Preto možno MAPK predstavuje do budúca potenciálny terapeutický cieľ v rámci tzv. target therapy (Elenita-Johnson, 2003). Z pohľadu patológa sú veľmi dôležité aj iné prediktívne parametre FL – neúplná infiltrácia LU, plazmocytová diferenciácia FL (ukazuje sa, že nemá väčší prognostický význam), vysoký proliferačný index (Ki-67

index), resp. súčasný výskyt FL a DLCL (určenie % podielu). Tak, ako existujú FL s prítomnou translokáciou t(14;18) a bez nej, existujú aj odlišnosti vo fenotypovej expresii Bcl-2 proteínu (pozitívne, úplne negatívne FL alebo FL s rôznym stupňom expresie Bcl-2 proteínu). Len celkom nedávno sa ako významný patologický a klinicky prediktívny parameter identifikoval typ imunitnej odpovede medzi nádorovými bunkami a bunkami hostiteľa. Ukazuje sa, že o správaní sa FL rozhoduje aj typ imunologickej odpovede. U FL je možné rozlišovať dva typy imunologickej odpovede - typ I. a typ II.. Typ I imunitnej odpovede je sprostredkovaný T-lymfocytmi a typ II monocytmi a makrofágmi. Pri I. type imunitnej odpovede je nádorovým bunkám ponechaná istá fyziologická „imunokompetencia“, čo sa v klinickom obraze prejavuje v tom, že FL, u ktorého prevláda typ I imunitnej odpovede, má priaznivejšiu prognózu a dlhšie prežívanie oproti skupine s II. typom imunitnej odpovede. Druhá skupina FL s prevládajúcim II. typ imunitnej odpovede, má horšiu prognózu a kratšie prežívanie. Z terapeutického hľadiska je zaujímavé, že pri FL s II. typom imunitnej odpovede sa gény pre expresie typu imunitnej odpovede prekrývajú s génmi rezistencie na rituximab (Gascoyne, 2004). Podstatným z tejto prednášky je posolstvo patológa o tom, že grading je dôležitý pre klinika na stanovenie predbežnej prognózy a zvolenie optimálnej terapie, ale histopatologický grading sám osebe nemusí mať kľúčový význam pre dlhodobé prežívanie. **Z pohľadu patológa má histopatologický grading FL veľmi heterogénnu reprodukovateľnosť a nemá ani racionálne jadro. Neexistujú totiž žiadne veľké a štandardizované štúdie, ktoré by na veľkej vzorke potvrdili, že stanovený počet centroblastov pre definovanie vysokého a nízkeho stupňa malignity je skutočnou hranicou medzi malígne a indolentne sa chovajúcimi FL.** Navyše sa ukazuje, že **proliferačný index (KI-67)** definuje agresívny FL nezávisle od ich histopatologického gradingu (Wand a kol., AJSP, 2005). Pre prežívanie majú navyše význam aj rôzne iné **prognostické indexy (FLIPI)**, ktoré sú nezávislé od histopatologického

gradingu. Je to už spomínaný **typ imunitnej odpovede hostiteľa** (T-fenotypová /monocytovo-makrofágová odpoveď), **expresia proliferáčného faktora MUM1** (Pileri a kol., 2006), ktorého prítomnosť na bunkách malígneho klonu predznačuje vysoko agresívnu formu FL a tiež **stupeň infiltrácia lymfatickej uzliny (LU)** napomáha rozlíšiť pokročilosť ochorenia. Kým neúplná infiltrácia LU je typická pre viac ako 90% začiatočných štádií FL, úplná infiltrácia LU je typická pre všetky pokročilé štádiá. Na poslednom mieste spomenul prognostické rozdiely medzi FL v závislosti od **lokalizácie lymfómu, veku a vzťahu k Bcl-2 génu/proteínu**. Z extranodálnych lymfómov je zaujímavý svojím biologickým správaním **primárny FL tenkého čreva**, ktorý je po morfologickej, fenotypickej aj genotypickej stránke veľmi podobný nodálnym FL. Na rozdiel od sekundárneho postihnutia čreva systémovým FL má však iný malígny potenciál. Patológ preto musí vedieť stopercentne odlíšiť primárny FL tenkého čreva od systémového FL so sekundárnym postihnutím čreva. Bunky primárneho FL tenkého čreva nesú na svojom povrchu „homing“ receptor, ktorý zaručuje, že ochorenie zostáva lokalizované na sliznicu tenkého čreva a nepostihuje napr. mezenterálne LU, resp. iné orgány. Takisto **kožný FL** zostáva vždy lokalizovaný a väčšinou neexprimuje ani Bcl-2. Má výbornú prognózu, ale zložitejšiu histologickú diagnostiku. Kožný FL má odlišný fenotyp aj biologické správanie ako nodulárny FL. **Nerastie v typických „folikuloch“, ale šíri sa difúzne a folikulárny rast je v epidermis často iba nenápadne naznačený. Oveľa viac býva vyznačená nodularita v podkožných infiltrátoch.** Osobitú skupinu predstavuje **FL u detí (pediatrický FL)**. Tento typ FL sa úplne odlišuje od dospelých. Veľmi často chýba typická translokácia t(14;18) a chýba aj expresia génu bcl-2. Zväčša ide o lokalizované ochorenie, ktoré postihuje často cervikálne LU a testikulárne tkanivo (tzv. primárny testikulárny detský FL). Detské FL, ktoré majú typickú translokáciu, znamenajú väčšinou už pokročilé štádiá (št. III-IV) a sú spojené so zlou prognózou (Lorsbach a kol., 2002).

Vzhľadom na odlišnosti priebehu a prognózy medzi nodálnymi a extranodálnymi FL sa natíska otázka, čo je oným rozhodujúcim markerom pre prognózu FL? **Nový koncept delenia FL podľa Goodlanda a kol. (2006) navrhuje delenie FL podľa prítomnosti alebo absencie typickej translokácie t(14;18) nezávisle od veku a topografie.** FL s typickou translokáciou majú vo vysokom percente vysokú expresiu Bcl-2 proteínu, ktorá vedie k inhibícii apoptózy a tým podmieňuje nekonečný rast nádoru. Ide vždy o generalizované ochorenie, často v štádiu III alebo IV v čase prvej diagnostiky. Prognosticky ide teda o indolentný, ale nevyliciteľný malígny lymfóm. Na druhej strane FL bez typickej translokácie t(14;18) a súčasne s nízkou alebo žiadnou expresiou Bcl-2 proteínu býva častejšie lokalizovaný v extranodálnych tkanivách, najmä v koži, častejšie sa diagnostikuje vo včasných štádiách (I-II) a má aj priaznivejšiu prognózu s možnosťou dosiahnutia kompletnej remisie. **Chýbanie translokácie t(14;18) a expresie Bcl-2 posúva váhy v prospech apoptotických mechanizmov, s čím súvisí aj vyššia pravdepodobnosť spontánnej alebo postterapeutickej remisie takéhoto biologického typu FL.** Kým u dospelých prevládajú biologicky menej priaznivé generalizované typy FL s translokáciou t(14;18), pre detský vek sú typické lokalizované FL bez t(14;18) s priaznivou prognózou.

### **Prietokovo – cytometrická diagnostika folikulových lymfómov**

O diagnostike FL pomocou prietokovej cytometrie hovorila **MUDr. L. Váleková (Klinika hematológie a transfuziológie, JLF UK a MFN Martin).** Prietoková cytometria je moderná diagnostická metóda, ktorá dopĺňa štandardné morfológické vyšetrenie o údaje, ktoré sa týkajú informácií o bunkových líniiach, o stupni diferenciácie a o klonovom pôvode buniek. Imunologická fenotypizácia umožňuje súčasne presnú klasifikáciu lymfoproliferatívneho ochorenia, čo má praktický význam pre stratifikáciu liečby aj stanovenie prognózy pacienta. Súčasné prietokové cytometre umožňujú detekovať na každej bunke viac molekúl súčasne. Diagnóza FL sa opiera o

fyzikálne vyšetrenie, histologické vyšetrenie LU, ktoré je doplnené vždy aj o trepanobiopsiu z lopaty bedrovej kosti (na stanovenie štádia ochorenia). Bioptické vzorky z týchto lokalít sa vyšetrujú imunohistochemicky, cytologicky a prietokovou cytometriou. FL je totiž hematologická malignita, ktorá je veľmi jasne definovaná histopatologicky, imunofenotypicky aj molekulárno-biologickými zmenami. **Exaktná diagnóza FL je založená na typickom morfológickom vzhľade (centrocyty až centroblasty), typických molekulárno – biologických a imunologických znakoch. Tieto typické charakteristiky môže dokázať prietoková cytometria, cytogenetika aj imunohistochemia.** Z imunofenotypických znakov je pre FL charakteristická expresia B-bunkových antigénov (CD19+, CD20+, CD22+, CD24+ a CD79a+), expresia antigénu CD10, ktorý však môže byť výnimočne negatívny a typická je aj negatívna expresia CD5 a CD43, ktorá pomáha odlíšiť FL od MCL a CLL. Expresia CD23 môže a nemusí byť prítomná. **Typickým znakom je tiež pomerne silná expresia sIg (IgM+/IgD > IgG > IgA) a reštrikcia ľahkých reťazcov.** Znaky CD11c a CD25 nebývajú exprimované, HLA-Dr a FMC-7 bývajú pozitívne. Na rozdiel od reaktívnych B-lymfocytov a od buniek nízko malígnych lymfómov býva pri FL slabo pozitívny aj znak CD44. Antigén CD20 je špecifickým povrchovým antigénom B lymfocytov, ktorý sa nevyskytuje na iných imunokompetentných bunkách. Začína sa objavovať v štádiu pre-B bunky a jeho expresia zaniká v štádiu diferenciácie B-lymfocytu do plazmocytu. Mnohé práce hovoria o tom, že intenzita expresie tohto znaku môže byť dôvodom rezistencie FL na rituximab. Dôkaz znaku CD10 je pri FL nemenej dôležitý ako dôkaz CD20. Ide o 100 kD membránový glykoproteín 2. typu, ktorý bol v minulosti počas dlhého obdobia známy aj ako CALLA antigén (common acute lymphoblastic leukemia antigen). Je detekovateľný vo viac ako 88 % FL a jeho selektívna expresia je veľmi užitočná na odlíšenie FL od ostatných low-grade NHL typu B. Tento znak je exprimovaný na bunkách FL, ale aj na bunkách lymfoblastového lymfómu a

na zreľých neutrofilných leukocytoch. Prietoková cytometria umožňuje tieto fyziologické expresie odlíšiť od patologických, práve vďaka schopnosti rozlíšiť viac molekulárnych znakov na povrchu bunky, napr. v prípade neutrofilného leukocytu koexpresiu (CD10+/CD19+). Znak CD10 je možné nájsť aj na nezreľých B-lymfocytoch v kostnej dreni aj v normálnych germinatívnych centrách. **Znak CD10 býva negatívny u ostatných low-grade lymfómoch (CLL-B, lymfóm z malých lymfocytov alebo hairy-cell leukémia, MCL, lymfocyto-plazmocytový lymfóm).** Imunofenotypizáciu FL pomocou prietokovej cytometrie je možné urobiť z lymfatickej uzliny, prípadne kostnej drene. MUDr. Váleková upozornila, že **imunofenotypizácia FL sa nedá urobiť z periférnej krvi**, pretože patologické bunky v periférnej krvi nebývajú zastúpené v dostatočnom množstve. To isté sa niekedy týka aj vzoriek kostnej drene, ak je infiltrácia drene ešte príliš slabá. V rámci diferenciálnej diagnostiky prietoková cytometria pomáha odlíšiť FL od B-CLL, SLL, LPL, MCL alebo HCL, ale **problémom môže byť Burkittov lymfóm a DLBCL, ktoré podobne ako FL môžu exprimovať na svojom povrchu marker CD10. Diagnostika vysoko malígnych lymfómov je preto založená predovšetkým na morfológii, a nie imunofenotypizácii.** Ak je však infiltrácia kostnej drene rozsiahla, znak CD71 môže pomôcť odlíšiť FL od DLBCL alebo od Burkittovho lymfómu. Stále však platí, že prietoková cytometria je len pomocná diagnostická metóda, ktorá má význam predovšetkým v diferenciálnej diagnostike lymfómov s nízkym stupňom malignity, u ktorých pomáha spresniť diagnózu typu NHL-B. V prípade už spomínaných lymfómov s vysokým stupňom malignity umožňuje imunofenotypizácia pomocou prietokovej cytometrie len ich zatriedenie do T alebo B línie. Aj v prípade Hodgkinovej choroby sú možnosti prietokovej cytometrie obmedzené. V tomto prípade je diagnóza predovšetkým morfológická, pretože imunofenotypizácia nie je celkom dobre možná pre veľmi nízke počty Hodgkinových a Sternbergovej-Reedových buniek. V závere svojej prednášky MUDr. Váleková zdôraznila nezastupiteľné miesto prietokovej

cytometrie v modernej diagnostike malígnych lymfómov. Pri vyššej frekvencii zmien môže stačiť na diagnostiku aj samotná prietoková cytometria. Druhou stránkou mince je to, že pri nižšej frekvencii alebo nepravidelnej distribúcii patologických zmien však môže viesť k zavádzajúcim výsledkom. Jej výhodou je rýchlosť vyšetrenia (výsledok je už v deň vyšetrenia), možnosť vyšetriť naraz veľkú populáciu suspektných buniek a možnosť vyšetriť viac antigénov na jednej bunke súčasne. Nevýhodou tohto vyšetrenia okrem už spomínaných kritických situácii je nemožnosť posúdiť pomocou cytometrie morfológiu buniek, ktoré nesú daný antigén. Prietoková cytometria preto naďalej zostáva doplňujúcim vyšetrením k histologickému a cytogenetickému vyšetreniu, ktoré spolu tvoria silný triumvirát exaktnej diagnostiky malígnych lymfómov.

### **Genetická diagnostika folikulového lymfóm**

Jasne definovaný fenotyp B bunkovej malignity FL má rôzny genotyp, ktorý rozhodujúcim spôsobom ovplyvňuje biologické správanie sa FL a aj jeho rezistenciu na liečbu. Genetickej diagnostike FL bola z tohto dôvodu venovaná aj ďalšia z ranného bloku prednášok, v ktorej hovorila **prim. MUDr. D. Ilenčíková (Oddelenie onkologickej genetiky NOÚ)**, ktorá neskôr prítomných oboznámila prítomných s cytogenetickou analýzou vlastného súboru vyšetrených pacientov s FL z roku 2006 (n=40). Translokácia **t(14;18)** je **prvou a špecifickou molekulárno-genetickou zmenou pri FL, ktorá sa udeje ešte v kostnej dreni. Táto zmena umožní vytvorenie nového antigén prezentujúceho receptora na povrchu B-lymfocytu, vďaka ktorému aberantný B-lymfocyt vycestuje do periférnej krvi a usídli sa v germinálnej zóne lymfatického folikulu.** Túto prvú zmenu sprevádzajú ešte mnohé iné molekulárne zmeny (class-switch rekombinácia alebo hypermutácie), ktoré sa však už výraznejšie neodlišujú od ďalších zmien, ktoré sú indukované samotným imunologickým prostredím LU. Recentné práce dokazujú, že imunologický vplyv mikroprostredia LU, predovšetkým vplyv folikulových dendritických buniek rozhoduje o tom, aká bude cytogenetická stabilita resp.

instabilita aberantných B-lymfocytov. MUDr. Ilenčíková avizovala, že v súčasnosti prebieha vo svete kolekcia relevantných imunologických a cytogenetických údajov, na základe ktorých bude možné v blízkej budúcnosti priamo z biopsie identifikovať viac cytologických, imunologických a molekulárnych prognostických faktorov a spoľahlivo predikovať, ako sa bude FL ďalej vyvíjať. V súčasnosti je už známa mapa sekundárnych chromozómových aberácií, s ktorými súvisia isté klinické znaky ochorenia. Napr. chromozómové aberácie 1p32-36 alebo 6q22-24 sú spojené s včasnou infiltráciou kostnej drene, „bulky disease“ zase sprevádzajú aberácie 3q21-25 alebo 13q32 (Offit, K. a kol., N Engl J Med, 1994). Táto mapa bola desaťrošie skúmaná a dopĺňaná, vďaka čomu vedci približne pred 3 rokmi identifikovali dve závažné patogenetické cesty, ktoré vznikajú v dôsledku skorých sekundárnych genetických aberácií. Ak po počiatočnej chromozómálnej zmene t(14;18) dôjde k delécií (-6q, +1g), nastane aktivácia folikulárných dendrítických buniek, ktoré vytvárajú spolu s B-bunkami „aktivačnú sieť“, ktorá aktivuje T-bunky. Výsledkom je narastanie kompartmentu interfolikulových buniek, ktoré potom vzájomnou interakciou s B-bunkami spôsobujú cytogenetické zmeny a rapídny prechod FL do DLBCL. Toto je chromozómálna „cesta zlej prognózy FL“. Ak po počiatočnej translokácii t(14;18) dôjde k inej chromozómovej zmene (+7,+8, +der(18)), B-bunky vo folikule proliferujú, ale folikulárne dendrítické bunky nie sú aktivované. To je príčinou, prečo genóm B-buniek zostáva dlhodobo stabilizovaný a klinicky sa takýto lymfóm prejavuje ako indolentný svojím rastom aj priebehom. Chromozómálne aberácie (+7,+8, +der(18)) sú teda zodpovedné za „chromozómálnu cestu dobrej prognózy“ (Dephne de Jong, JCO, 2005). Samozrejme, časom môže dôjsť k sekundárnym chromozómálnym zmenám (-17, +12, +1q, +X,-1p, atď.), ktoré v konečnom dôsledku môžu vyústiť do DLBCL.

Na oddelení onkologickej genetiky NOÚ používajú okrem konvenčnej cytogenetiky k stanoveniu chromozómových aberácií aj iné špeciálne metódy

(iFISH, mFISH, CGH, molekulárno-genetická diagnostika). Metodickým základom citlivej detekcie týchto zmien je 72 h kultivácia periférnej krvi s PKW alebo 24 h kultivácia kostnej drene, ktorou sa sleduje indukcia proliferácie nádorových línií, aby sa tým dali genetické zmeny ľahšie zachytiť. V prezentovanom súbore pacientov s FL (n=40), ktorí boli vyšetrení na pracovisku autorky v priebehu roku 2006 sa len u 7 dokázala infiltrácia kostnej drene. U týchto pacientov sa pomerne úspešne zmapoval genetický vývin malígneho klonu B buniek. **U 32 pacientov s histologicky potvrdeným FL sa nepotvrdil infiltrácia kostnej drene, t.j. v kostnej dreni sa nedokázali použitými metodikami žiadne bunky, ktoré by niesli znaky typickej translokácie, avšak zaujímavé je, že táto translokácia sa nenašla ani u všetkých pacientov s FL a infiltráciou kostnej drene** (typická translokácia sa v tomto prípade našla len u 4 zo 7 pacientov), a to ani vtedy, ak sa použili viaceré diagnostické metódy. Zavedené metodiky slúžia na detekciu infiltrácie kostnej drene, ale nie je známe, aké markery je potrebné hľadať v LU. Preto sa Oddelenie onkologickej genetiky NOÚ v spolupráci s martinským pracoviskom rozhodlo zahájiť projekt „Identifikácie primárnych a sekundárnych genetických zmien ako prediktívneho faktora biologického chovania vybraných malígnych lymfómov v slovenskej populácii“ (Projekt MZ SR č. 2005/16-NOU-01). V rámci tohto projektu sa vybraný výskumný tím pokúša nájsť algoritmy najefektívnejších vyšetrovacích postupov na zistenie genetických zmien. V rámci toho je však potrebné prácu na Slovensku skvalitniť. **Prim. MUDr. Ilenčíková vyzvala všetkých prítomných k čo najefektívnejšej spolupráci najmä pri odberoch biologických materiálov pri podozrení na NHL-B. Jej pracovisko sa rozhodlo, nevyšetrovať paušálne génovými metodikami všetky vzorky od pacientov so susp. NHL-B.** Analýza 65 prípadov s diagnózou susp. NHL-B ukázala, že paušálne genetické vyšetrenie je neefektívny postup. Vyšetrením KD viacerými metodikami sa totiž v spomínanom súbore nenašli chromozómové aberácie až u 57 pacientov! U 2

pacientov išlo o MCL, u 4 o CLL a len v 2 prípadoch išlo o infiltráciu kostnej drene pri FL. Preto **NOÚ zmenil nedávno aj algoritmus pri genetickom vyšetrení kostnej drene u pacientov so susp. NHL-B.** Pri suspekcii na NHL-B bude Cytogenetické laboratórium NOÚ vzorky (z PK, KD, LU) len archivovať v suspenzii (po predchádzajúcej inkubácii) a separovať leukocyty z PK pre DNA vyšetrenie. Až po telefonickom potvrdení diagnózy sa uskutoční komplexné genetické vyšetrenie. **Pri plánovanom odbere lymfatickej uzliny je potrebné vzhľadom na rýchlu degradáciu RNA vopred informovať cytogenetické laboratórium NOÚ v Bratislave (tel. 02-59378485/379/581), aby sa zabezpečili nevyhnutné podmienky pre kvalitné uchovávanie vzorky počas aj po transporte. Len kvalitne odobratá a uchovaná vzorka môže klinikom poslúžiť na spoľahlivé sledovanie dynamiky ochorenia, jeho odozvy na liečbu, apod.**

Druhá sekcia prednášok, ktorej predsedníctvo tvorili **MUDr. T. Papajík** a **MUDr. A. Vranovský**, bola venovaná indukčnej liečbe FL, druhej a tretej línii liečby a udržiavacej liečbe FL.

### **Všeobecná stratégia indukčnej liečby FL**

Stratégiou prvolíniovej liečby FL sa vo svojej prednáške zaoberala **MUDr. A. Kafková (KhaOH FsNP L. Pasteura, Košice)**. Podľa jej prehľadu v literatúre sa síce FL nachádza na druhom mieste vo výskyte medzi ostatnými typmi NHL, ale zo všetkých indolentných lymfómov sa vyskytuje najčastejšie. K typickým molekulárno – biologickým zmenám patrí už spomenutá translokácia t(14;18), (q32;q21), ktorá je prítomná u približne 85 % pacientov v štádiách FL G1 a FL G2. Typická je tiež expresia onkoproteínu Bcl-2, ktorý súvisí s inhibíciou apoptózy v malígnom klone, ako aj rezistenciou na liečbu. K vzácnym biologickým ekvivalentom FL patria translokácie t(2;18) (p11;q21) a t(18;22) a (q21;q21) (Gordon, W. A kol., 2000). Klinický obraz ochorenia je veľmi variabilný. Ochorenie najčastejšie postihuje LU a veľmi rýchlo generalizuje. V čase stanovenia diagnózy je 75 % pacientov v pokročilých štádiách ochorenia

(III-IV) a v 40 % prípadov sa dokáže už aj postihnúť kostnej drene. Mnohí pacienti sú ešte aj v pokročilom štádiu asymptomatickí. V ojedinelých prípadoch boli popísané spontánne remisie, v tretine prípadov dochádza k transformácii FL do lymfómu s vyšším stupňom malignity (DLBCL). Ochorenie sa vyskytuje typicky vo veku nad 60 rokov (40%), pomer mužov a žien je 1:1,7. **FL má typicky chronický, relabujúci a remitujúci priebeh, pričom ochorenie je z dnešného pohľadu kurabilné len v iniciálnych štádiách, ktoré sa však zachytia len u neceljej tretiny pacientov.** Pre stanovenie prognózy FL bol vytvorený prognostický index, tzv. FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index; Solal-Celigny a kol., 2002). FLIPI index rozpoznáva 5 rizikových parametrov – vek, štádium, LDH, hodnotu hemoglobínu a počet lymfómom postihnutých oblastí. Na základe hodnôt týchto parametrov sa každému rizikovému faktoru prisudzuje počet bodov od 0-1. FLIPI 0 znamená, že prognóza ochorenia je veľmi dobrá, pravdepodobnosť 10-ročného prežitia je 71 %. Ide väčšinou o pacientov mladších ako 60 rokov, ktorí boli zachytení v štádiu I-II. FLIPI 1-2 znamená intermediárnu prognózu, medián desaťročného prežívania v tejto skupine je nižší, cca 51 %. Ak je FLIPI 3-4, prognóza je zlá a pravdepodobnosť desaťročného prežitia je približne 20 %. Existujú však aj iné práce, ktoré sa zaoberali vytypovaním iných prognostických markerov, ktoré sú nezávislé od FLIPI. Vo svojej práci dokázal Dave, S. z 95 bioptických vyšetrení (Dave, S. S. a kol., New Engl J Med, 2004) vyselektovať gény spojené s priaznivou aj s nepriaznivou prognózou. Tento prognostický profil génovej expresie, ktorý pomerne spoľahlivo určuje pravdepodobnosť prežívania, nezávisle od IPI, sa však u nás zatiaľ nepoužíva. **Aj keď sa v literatúre udáva, že priemerné celkové prežívanie (OS) u 57 % pacientov je 10 rokov (Federico a kol., 2000), domnievajú sa mnohí onkológovia, že v bežnej, neselektovanej populácii pacientov s FL je tento podiel dlho prežívajúcich podstatne nižší. MUDr. Kafková citovala napríklad prácu, v ktorej medián celkového prežívania bol 5,6 roka v 57 % prípadov (Wood a kol., 1999).** Na

rozdiel od iných indolentných lymfómov, je potrebné stratégiu „watch and wait“ veľmi starostlivo zvážiť, už aj s ohľadom na skutočnosť, že kurabilné sú štádiá I-II. Lymfómová skupina SR odporúča zvoliť takúto stratégiu len u starších asymptomatických pacientov. **Indukčná terapia je indikovaná podľa tzv. GELF kritérií „veľkej nádorovej masy“** (Solal-Celigny a kol., 1993). **Okamžitú liečbu vyžaduje nodálna alebo extranodálna masa tumoru s priemerom  $\geq 7$  cm, postihnutie LU najmenej v 3 lokalitách, pričom každá má priemer  $\geq 3$  cm, ak sú prítomné celkové príznaky (B-symptómy), splenomegália, serózne výpotky, postihnutie orbity alebo epidurálneho priestoru, kompresia ureteru a leukémia. Okrem týchto kritérií sa liečba zahajuje aj pri cytopénii z útlaku KD, pri poškodení orgánu alebo systému lymfómom, pri prítomnosti „bulky choroby“ a v neposlednom rade pranie pacienta zahájiť liečbu.** Iniciálna liečba v klinickom štádiu I-II spočíva v totálnej chirurgickej extirpácii nádorovej masy a RAT, u štádií I a II s vyšším rizikom je táto terapia doplnená ešte aj o krátku chemoterapiu. **Za rizikové faktory pre lokalizované štádiá I a II sa považuje prítomnosť veľkosti tumoru  $\geq 2,5$  cm v štádiu I a v štádiu II veľkosť tumoru  $\geq 2,5$  cm a súčasné postihnutie dvoch nesusediacich lokalizácií.** V štádiu I s nízkym rizikom sa takouto liečbou dosiahne dlhodobé bezpríznakové ochorenie, presahujúce často 10 rokov. Pri lokalizovaných málo pokročilých štádiách I-II s nízkym rizikom je možné dosiahnuť s pomocou RAT aj kompletne vyliečenie. V odporúčaníach slovenskej Lymfómovej skupiny sa vek považuje za jeden z významných diskriminačných faktorov pre rozhodnutie o type liečby, pričom MUDr. Kafková zdôraznila, že **ide o biologický, a nie kalendárny vek pacienta, ktorý je tým diskriminačným faktorom, ktorý rozhodne o type zvolenej iniciálnej liečby.** U vysokorizikových pacientov v štádiu II sa u mladších pacientov (vek  $\leq 65$  rokov) odporúča v prvej línii 6-8x R-CHOP eventuálne 6-8x R-CVP. U starších pacientov sa odporúča v prvej línii 6-8x R-CVP alebo 6-8x R-CHOP. Väčšina pacientov je však diagnostikovaná v štádiu III a IV, kedy úspešnosť

terapie už nebýva taká vysoká. V týchto štádiách sa v iniciálnej terapii používa chemoterapia (6-8x R-CHOP / 6-8x R-CVP). Ak je pacient vo veku  $\leq 65$  rokov a dosiahol po indukčnej liečbe kompletnú remisiu, môže dostať udržiavaciu liečbu interferónom IFN-alfa (3x 3-6 MIU/týždeň). Otázkou zostáva, či pokračovať aj v liečbe rituximabom po prvej línii. Odpoveď na túto otázku by mala priniesť blízka budúcnosť v podobe randomizovanej a kontrolovanej klinickej štúdie. Ak sa dosiahla remisia po úvodnej liečbe a pacient je výrazne starší (vek  $\geq 65$  rokov), je možné pacienta ponechať bez terapie a ďalej sledovať. Ak išlo o vyššie štádia ochorenia a dosiahla sa iba parciálna remisia, je možné pokračovať inými režimami (FCR, R-FND, R-FCM eventuálne FC, FND, FCM, DHAP, ESAP), prípadne zvážiť autológnu transplantáciu kostnej drene s in vitro alebo in vivo purgingom. U starších pacientov ( vek  $\geq 65$  rokov), ktorí nie sú vhodní na transplantáciu kostnej drene, ale sú v dobrom klinickom stave, je možné zvážiť pokračovanie chemoterapie v monoterapii fludarabínom prípadne FC, eventuálne podať paliatívnu RAT alebo inú paliatívnu liečbu. Toto sú v súčasnosti smernice slovenskej Lymfómovej skupiny pre liečbu FL, ktoré sú dostupné jednak na webovej stránke Lymfómovej skupiny SR ([www.lymphoma.sk](http://www.lymphoma.sk)), na ktorej aj prebieha kontinuálna aktualizácia, jednak vyšli v januári 2007 ako samostatná publikácia pod názvom „Stratégia liečby malígnych lymfómov“. V ďalšej časti svojej prednášky citovala MUDr. Kafková niekoľko klinických štúdií, z ktorých Lymfómová skupina vychádzala pri tvorbe týchto smerníc. **Základom systémovej liečby vysokorizikových ohraničených štádií aj pokročilých štádií FL je monoklonálna protilátka rituximab.** Dnes tradične citovaná Marcusova klinická štúdia **M39021** (Marcus, R. A kol., Blood, 2005) porovnávala v indukčnej liečbe štádií III-IV folikulového lymfómu (vek  $\geq 18$  rokov) dva terapeutické režimy, a to CVP x 4 cykly s R-CVP x 4 cykly s následným restagingom a pokračovaním identickej schémy. V ramene CVP sa dosiahla celková terapeutická odpoveď (ORR) u 57 % pacientov, ale v ramene R-CVP až v 80,9%. Navyše kompletné remisie sa dosiahli v ramene R-

CVP v štatisticky významne vyššom počte prípadov, ako pri liečebnom režime CVP (30 % versus 8 %). **Trvanie liečebnej odpovede po pridaní rituximabu do iniciálnej chemoterapie s režimom CVP sa taktiež ukázalo ako klinicky aj štatisticky signifikantne dlhšie.** V štúdií M39021 bola doba sledovania 42 mesiacov (UPDATE ASH 2005), pričom priemerná doba prežívania v ramene R-CVP bola 37,7 mesiacov, zatiaľ čo v ramene CVP len 13,5 mesiacov, čo bolo štatisticky výrazne signifikantné ( $p < 0.0001$ ) (Solal-Celigny, P. A kol., Abstract 350, ASH, 2005). Čas do progresie (TTP) bol podľa updatovaných údajov z ASH 2006 v tejto istej štúdií výrazne dlhší v ramene R-CVP oproti CVP (34 mesiacov versus 15 mesiacov)(Marcus, R. a kol., Abstract 481, ASH, 2006). Zhrnutie doterajších výsledkov zo štúdie M39021 jednoznačne svedčí o tom, že **kombinácia R-CVP preukázala jednoznačne lepšie klinické výsledky liečby pre pacientov s pokročilým FL v 1. línii, a to vo vyššom podiele celkových terapeutických odpovedí, dlhšom trvaní liečebnej odpovede aj v trvaní času do progresie. Zdá sa, že tieto výsledky budú mať impact aj na celkové prežívanie pacientov s pokročilým FL.**

Nemecká štúdia GLSG mala podobný dizajn, pričom porovnávala efektívnosť iniciálnej liečby R-CHOP s CHOP u pacientov s pokročilým FL, ktorí mali viac ako 60 rokov,  $\geq 3$  rizikové faktory a neboli predliečení. Priemerná doba sledovania bola 48 mesiacov. V tejto štúdií sa rovnako ako v predchádzajúcej povrdilo, že pridanie monoklonálnej protilátky rituximabu k režimu CHOP v indukčnej liečbe starých a rizikových pacientov s FL významne predĺžilo čas do zlyhania terapie TTF (5 rokov versus 2,1 roky,  $p < 0.0001$ ), čas do progresie PFS-4 roky (62,2% versus 27,9 %,  $p < 0.0001$ ) a hranične viac pacientov v ramene R-CHOP preživalo 4 roky (OS 90% versus 81%,  $p = 0.039$ ) (Buske, CH. a kol., ASH, 2006). V indukčnej liečbe FL sa v súčasnosti používa viac druhov režimov. **East Germany Study Group** skúmala iný režim v prvej línii terapie pokročilého FL (+MCL), a to režim MCP, ktorý porovnávala s rovnakým režimom, ale v kombinácii s rituximabom, t.j. R-MCP. Do tejto štúdie bolo

zaradených 358 pacientov, ktorí neboli predliečení. Po 47 mesiacoch sledovania sa ukázalo, že rameno R-MCP má štatisticky veľmi významne oproti ramenu s MCP vyšší počet odpovedí na terapiu (RR 92,4% versus 75 %,  $p=0.0004$ ), ale aj medián prežívania bez choroby DFS ( $p<0.0001$ ) a medián trvania doby bez progresie choroby PFS ( $p<0.0001$ ). Celkové 4 ročné prežívanie bolo tiež vyššie v ramene R-MCP (87% versus 74 %,  $p=0.039$ ) (Harold, M. a kol., Abstract 484, ASH 2006). **Vychádzajúc z týchto, ale aj ďalších klinických štúdií sa v súčasnosti kombinácia rituximabu s chemoterapiou stala zlatým štandardom v indukčnej liečbe FL. Otázkou naďalej zostáva, ktorá chemoterapia je k rituximabu najvhodnejšia.** Existuje dostatok dát, ktoré implikujú, že R-CHOP má vyššiu efektívnosť ako R-CVP a tiež, že R-CHOP je nadradená k R-MCP. Ďalším diskutovaným problémom v klinickej praxi je otázka, či sa má v indukčnej liečbe pokročilého štádia FL použiť antracyklín alebo nie. Toto chemoterapeutikum si mnohí onkológovia „šetrili“ na neskoršie štádiá, resp. sa mu vyhýbali z obavy pred jeho deklarovanou kardiotoxicitou. Viaceré údaje z USA aj Kanady svedčia o tom, že **antracyklín** má svoje miesto v prvej línii liečby pokročilého FL, nakoľko sa po indukčnej liečbe týmto cytostatikom dokázala signifikantná redukcia rizika transformácie FL do agresívnejších foriem (retrospektívna štúdia BCCA). V prípade kardiotoxicity môže už v súčasnosti nahradiť klasický antracyklín PLD ako alternatíva. V závere prednášky MUDr. Kafková zdôraznila, že **rituximab v kombinácii s rôznymi chemoterapeutickými režimami (R-CVP, R-CHOP, R-FCM, R-MCP) je zlatým štandardom indukčnej liečby pokročilých štádií FL (III a IV). Má najvyšší počet liečebných odpovedí aj prežívaní bez progresie choroby a výsledky z posledných rokov naznačujú, že má pravdepodobne dopad aj na celkové prežívanie.** Okrem toho rituximab má synergizmus s niektorými chemoterapeutikami (doxorubicin) a nemá nežiaduce účinky, ktoré sú typické pre konvenčnú CHT. **Špecifickosť liečby monoklonálnou protilátkou rituximabom aj jej synergizmus s konvenčnou CHT umožňuje**

**dosiahnuť u značného počtu pacientov s FL eradikáciu malígneho klonu až na molekulovej úrovni (BCL<sub>2</sub> gén), t.j. dosiahnuť molekulovú remisiu.**

### **Liečba FL v relapse – druhá a ďalšie línie liečby**

Indolentné lymfómy sú tradične chápané ako nevyliciteľné. FL je tiež konvenčne chápaný ako recidivujúca a relabujúca choroba, z čoho vyplýva aj problém opakovanej nutnosti voliť vhodnú liečbu pri ďalších relapsoch. To, prečo lymfóm relabuje, je nemožnosť eliminácie zvyškovej choroby štandardnou chemoterapiou v dôsledku pomalej proliferácie nádorových buniek, povedal na úvod svojej prednášky **MUDr. Tomáš Papajík (Hemato-onkologická klinika, FNŠP Olomouc)**. Vo svojej prednáške načrtol vynárajúce sa nové a početné možnosti liečby relabujúceho FL. **Indukčná terapia má svoje nezastupiteľné miesto najmä u včasných štádií FL, kde môže mať kurabilný potenciál, kým u pokročilých štádií vedie len k remisii. Chemoterapia v iniciálnej fáze liečby FL má okrem pozitívnych aj niektoré negatívne stránky. Vedie k selekcii klonov, ktoré majú genetické zmeny, ktorých počet sa s progresiou ochorenia zvyšuje, čoho výsledkom môže byť rezistencia na liečbu, skracovanie doby do ďalšieho relapsu alebo dokonca histologická transformácia NHL.** V súčasnosti majú onkohematológovia k dispozícii istý počet ukazovateľov, na základe ktorých môžu predvídať ďalší priebeh ochorenia. K prognostickým faktorom relapsu FL patrí doba od začiatku remisie do relapsu (Montoto, 2002), FLIPI pri relapse (Montoto, 2004), genetické zmeny v malígnom klone a histologický nález v LU/tkanive. Práca talianskych autorov (Montoto a kol., 2002) dokázala, že **štatisticky významne lepšiu prognózu a prežívanie (OS) majú tí pacienti, u ktorých došlo k relapsu po viac ako 2 rokoch od dosiahnutia remisie indukčnou liečbou (p=0.012), zatiaľ čo pacienti, u ktorých je doba do relapsu kratšia ako 2 roky, majú vždy horšiu prognózu.** MUDr. Papajík sa vo svojej prednáške zamerail len na niektoré kľúčové práce z posledných rokov, ktoré hovoria o súčasných možnostiach aj úskaliach liečby relapsov FL. Na prvom mieste

spomenul prácu, ktorá porovnávala konvenčnú CHT s FCM s imunochemoterapiou R-FCM u relabujúceho FL. Pridanie rituximabu k chemoterapii viedlo k zásadnému zvýšeniu celkového počtu remisií (40 % versus 23 %) a kým medián prežívania bez progresie (PFS) sa v ramene FCM nedosiahol, v ramene R-FCM bolo 21 mesiacov ( $p=0.01$ ) (Forstpointner, 2004). V inej štúdii, ktorá porovnávala observačný režim s postindukčnou udržiavacou liečbou sa pri observačnom režime nedosiahlo významne dlhšie prežívanie bez progresie (PFS) ako v ramene, v ktorom sa pri udržiavacej liečbe FL po relapse k FCM pridal aj rituximab ( $p=0.035$ ) (Forstpointner, 2006). V súčasnosti sa stáva pomaly reálnou aj možnosť liečby relabujúceho FL pomocou rádioimunoterapie. Ide o kombináciu protilátky anti-CD20, na ktorú je naviazaný izotop yttria - <sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetanu (Zevalin®). Fáza III klinického skúšania porovnávala efektívnosť <sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetanu v porovnaní s rituximabom v liečbe 143 chorých s relabujúcim alebo transformovaným NHL-B (73 pacientov sa liečilo <sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetanom a 70 dostávalo rituximab). **Terapeutická odpoveď na rádioimunoterapiu bola veľmi vysoká – RR 80 % v prospech <sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetanu, zatiaľ čo pre rituximab sa dosiahla RR 56 % ( $p=0.002$ ), avšak trvanie dosiahnutej terapeutickkej odpovede medzi oboma terapeutickými skupinami sa štatisticky signifikantne nelíšilo a bolo bez rozdielu aj v celkovom prežívaní** (Witzig, 2002). Dá sa teda povedať že Zevalin® síce zlepšuje percento terapeutickkej odpovede, ale jeho postavenie v liečbe FL ešte nie je dané. Je tiež veľmi pravdepodobné, že v budúcnosti bude vyžadovať kombináciu s inými terapeutickými modalitami, ktoré zatiaľ nie sú dobre známe. Pred érou imunochemoterapie predstavovali autológne transplantácie záchrannú terapiu najmä u mladých chorých s relabovaným FL. Štúdia z Bostonu skúmala efektívnosť **autológnej transplantácie** u 153 chorých s relabovaným FL, u ktorých sa uskutočnilo pred transplantáciou čistenie kostnej drene monoklonálnymi protilátkami anti-CD10, anti-CD19 a anti-CD20. Táto štúdia

fázy II dosiahla veľmi optimistické výsledky, keďže až v 42 % sa dosiahol DFS v 66 % OS po 8 rokoch od transplantácie a dokonca 69 % pacientov preživalo 12 rokov od diagnózy FL (Freedman, 1999). **Prínos Freedmanovej práce bol však najmä v tom, že na súbore transplantovaných dokázal, aký význam má dosiahnutie molekulárnej remisie pre prognózu pacienta s FL. V súčasnosti sa od tejto práce odvíjajú liečebné postupy, ktorých cieľom je dosiahnutie PCR negativity kostnej drene, či už v rámci autológnej transplantácie alebo imunochemoterapie, keďže pacienti s molekulárnou remisiou majú významne dlhší interval do ďalšieho relapsu aj dlhšie prežívajú.** V rámci výskumu nových terapeutických modalít sa ukazuje, že Zevalin® by sa mal použiť v príprave pred autológnu transplantáciu kostnej drene. Klinická štúdia vo fáze I/II použila <sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetan v kombinácii s vysoko dávkovaným etopozidom a cyklofosfamidom pred autológnu transplantáciu u relabovaných NHL-B (FL, DLBCL, MCL) a dokázala, že celkové prežívanie po 2 rokoch od výkonu je veľmi uspokojivé - OS 92 % a RFS bol 78 %, ale krivka prežívania bez príznakov choroby DFS bola excelentná predovšetkým u pacientov s FL (Nademanee, 2005). Aj keď je tento postup zatiaľ len experimentálny, jeho výsledky sú veľmi nádejné. Ďalšou molekulou vhodnou pre rádioimunoterapiu FL sa ukazuje <sup>131</sup>I-anti-CD20, ktorá sa už v USA použila v klinickej štúdii (n=27) v kombinácii s konvenčnou vysoko dávkovanou prípravňou terapiou (n=98) pred autológnu transplantáciu kostnej drene u relabovaných FL. Príprava pacientov rádioimunoterapiou a vysoko dávkovanou konvenčnou terapiou dokázala takmer dvojnásobne zvýšiť 5-ročný PFS oproti konvenčnej prípravnej terapii (48 % versus 29 %) a zlepšiť celkové prežívanie 5 rokov po transplantácii (OS 67 % versus 53 %) (Gopal, 2005). Ukazuje sa však, že **alogénna transplantácia kostnej drene má tiež vysoký kurabilný potenciál vďaka indukovanej imunitnej reakcii štetu proti hostiteľovi, pri ktorej bunky štetu deštruujú aj reziduálne nádorové bunky.** Alogénna transplantácia tým umožňuje redukovať intenzitu a tým aj

toxicitu prípravných režimov. V klinických sledovaniach dokázala alogénna transplantácia kostnej drene významne znížiť pravdepodobnosť relapsu u relabujúcich FL a u lymfómov rezistentných na liečbu (Van Besien, 2003). Táto metóda liečby môže byť kurabilnou liečbou dokonca aj pre relabované alebo chemorezistentné FL. Dokázala to ďalšia štúdia z USA, ktorá alogénnou transplantáciou, ktorej predchádzal prípravný režim s redukovanou intenzitou (obsahoval alemtuzumab) dokázala predĺžiť prežívanie po 3 rokoch u 73 % pacientov s NHL refraktérnymi na liečbu (Morris, 2004). Pri výbere z širokej ponuky súčasných možností liečby relabovaných FL by po individuálnom posúdení každého pacienta (biologický vek, klinický stav, predchádzajúca liečba, komplikácie, terapeutický zámer) mal ošetrojúci lekár na prvom mieste brať do úvahy kvalitu života pacienta, uzavrel svoju prednášku MUDr. Papajík.

### **FL a udržiavacia liečba**

Keďže indukčná liečba nie je schopná eliminovať všetky malígne bunky, u FL je veľmi často nutná následná udržiavacia liečba. Jej úlohou je predĺžiť remisiu, zlepšiť jej kvalitu tým, že parciálnu remisiu zmení na kompletnú, prípadne eradikuje minimálnu reziduálnu chorobu. V závere je teda hlavným cieľom udržiavacej liečby predĺženie prežívania, povedal **MUDr. A. Vranovský (NOÚ, Bratislava)**. Historicky sa v udržiavacej liečbe FL kedysi používali alkylačné látky, ktoré mali kapacitu dosiahnuť predĺženie času do progresie, ale za cenu vysokej toxicity, ktorá sa prejavovala najmä formou sekundárnych myelodysplázií a AML. Od tejto toxickej udržiavacej liečby sa preto postupne upustilo. Ďalšou látkou, ktorá sa ešte nedávno používala a ešte aj dnes sa používa v niektorých krajinách ako udržiavacia terapia FL, je liečba IFN-alfa v kumulatívnej dávke 36 MIU/mesiac. Meta-analýza viacerých štúdií dokázala, že podávať IFN-alfa v udržiavacej liečbe má zmysel len vtedy, ak sa podáva vo veľmi vysokých dávkach a ak je kombinovaný s predchádzajúcim intenzívnym indukčným režimom (antracyklínovým alebo tzv. francúzskym CHOP-om). **Výhody rituximabu v udržiavacej liečbe sú dané jeho vysokou účinnosťou -**

**aj v monoterapii dosahuje minimálne 50 % - 80 % terapeutickú odpoveď, selektívnou redukciou nádorových CD20+ buniek, dostatočne dlhý biologický polčas (20-21 dní), nízkou akútnou aj chronickou toxicitou a dodnes nie je známa ani kumulatívna toxicita.** V súčasnosti sú už k dispozícii viaceré dáta o efektívnosti a bezpečnosti rituximab v udržiavacej liečbe FL. Ide najmä o štúdie **SAKK 35/98, ECOG 1496, EORTC 20981 a GLSG.** Schémy udržiavacej liečby sú v rôznych štúdiách rôzne. Používa sa dávkovanie každé 3 mesiace (štúdia EORTC), každé 2 mesiace (štúdia PRIMA), alebo tzv. Hainsworthov model, pri ktorom sa podávajú za sebou 4 dávky v týždňových intervaloch s následnou 6-mesačnou pauzou. Doteraz sa neuskutočnili porovnávacie štúdie, takže nie je jasné, ktorá schéma je klinicky účinnejšia. MUDR Vranovský sa následne podrobnejšie zaoberal medzinárodnou **štúdiou EORTC 20981**, na ktorej participovalo aj Slovensko a ktorá bola vlastne veľkou registračnou štúdiou určenou na schválenie indikácie rituximabu v udržiavacej liečbe FL. Išlo o štúdiu, do ktorej boli zaradení pacienti s relapsovaným alebo rezistentným FL G1-G3, v štádiu III-IV, ktorí mali v predchádzajúcom období maximálne 2 neantracyklínové režimy a neboli liečení rituximabom, KR, PR, SD alebo PD po prvom alebo druhom režime a posledná liečba bola podaná najmenej 2 mesiace od monoterapie alebo dvoch cyklov polychemoterapie. Pacienti boli randomizovane rozdelení do dvoch terapeutických ramien. V prvom ramene dostali CHOP každých 21 dní, maximálne 6 cyklov, v druhom ramene dostali rituximab v kombinácii s CHOP v rovnakých časových intervaloch aj počte cyklov. Primárnym cieľom štúdie bolo zistiť, či kombinovaná liečba (chemoterapia s imunoterapiou) skutočne zvyšujú percento terapeutických odpovedí oproti klasickému režimu. U pacientov, ktorí dosiahli kompletnú alebo parciálnu remisiu, sa uskutočnila druhá randomizácia, ktorou sa pacienti rozdelili na dve skupiny. V jednej boli pacienti len sledovaní, zatiaľ čo v druhej dostávali rituximab ako udržiavaciu liečbu v dávke 375 mg/m<sup>2</sup> každé 3 mesiace počas obdobia 2 rokov alebo do

najbližšieho relapsu. Oba podsúbory boli veľmi dobre vyvážené a základné charakteristiky pacientov (vek, štádium, bulky masa, B-symptómy, infiltrácia KD, FLIPI $\geq$ 2, odpoveď na predchádzajúcu chemoterapiu) boli porovnateľné. **Pacienti s FL, ktorí dostávali udržiavaciu liečbu rituximabom preživali od druhej randomizácie bez progresie priemerne 51,6 mesiacov, zatiaľ čo pacienti bez udržiavacej liečby len 15 mesiacov. Udržiavacia liečba rituximabom teda predĺžila prežívanie bez progresie v priemere o 3 roky** (Van Oers, M. a kol., Blood, 2005). Ak sa uskutočnila analýza týchto výsledkov podľa typu indukčnej liečby, dokázalo sa, že rituximab v udržiavacej liečbe je efektívnejší ako len observácia aj u pacientov, ktorí v indukčnej liečbe už rituximab dostali (t.j. indukčná terapia bola R-CHOP). U týchto pacientov, ktorí mali rituximab aj v indukčnej terapii sa prežívanie predĺžilo na 51, 9 mesiacov, zatiaľ čo v skupine, ktorá dostala rituximab až v udržiavacej liečbe bol medián prežívania 42,2 mesiaca. Na tom nič nemení podstatný fakt, že udržiavacia liečba rituximabom po oboch typoch indukčnej liečby klinicky aj štatisticky signifikantne predĺžila prežívanie. Pomerne veľkým prekvapením bolo priemerné celkové prežívanie OS od druhej randomizácie, ktoré síce zatiaľ nebolo oficiálne zverejnené, ale už sa podľa predbežných výsledkov štatistických výpočtov vie, že rituximab v prvých 39 mesiacoch od začiatku liečby redukuje riziko úmrtia na polovicu a tento rozdiel má tendenciu sa časom zväčšovať. **Zo štúdie EORTC 20981 teda pre klinickú prax celkom jednoznačne vyplynulo, že udržiavacia liečba rituximabom zlepšuje prežívanie bez progresie (medián PFS sa predĺžil o 36,6 mesiacov) u všetkých pacientov s FL bez rozdielu typu indukčnej liečby a predlžuje aj celkové prežívanie (OS-3 roky boli predĺžené zo 77.1 % na 85,1%).** Porovnanie OS medzi jednotlivými podskupinami ešte vyžaduje dlhšie sledovanie. Rituximab sa ukázal ako účinný nielen v indukčnej liečbe FL, ale aj v udržiavacej terapii po indukčnej liečbe FL, po liečbe relabujúceho alebo refraktérneho FL a tiež po rôznych indukčných režimoch (chemoterapia,

rituximab v monoterapii, chemoimunoterapia). Zatiaľ nejasné zostáva, aká je optimálna dávka a intervaly medzi jednotlivými dávkami, aký je vplyv udržiavacej liečby rituximabom na dlhodobé celkové prežívanie a aký je dlhodobý bezpečnostný profil tejto chimérickej monoklonálnej protilátky. V štúdií EORTC 20981 sa sledovali aj nežiaduce účinky počas terapie rituximabom (leukopénie, neutropénie, infekcie, kardiálne, pľúcne kožné), ktoré sa porovnávali s ramenom bez terapie pričom medzi oboma ramenami sa okrem častejších infekcií v ramene s rituximabom nezaznamenali významné rozdiely. **Vyššia incidencia infekčných komplikácií u pacientov, ktorí dostávali udržiavaciu liečbu rituximabom znamenala predovšetkým častejšie bakteriálne a vírusové infekcie dýchacích ciest, z ktorých väčšina však nebola závažná (väčšinou stupeň 1-2, len ojedinele stupne 3-4) a počas udržiavacej liečby sa nezaznamenala žiadna fatálna infekcia.** Navyše sa počas dvojročného sledovania (trvanie udržiavacej liečby) nepozorovala kumulácia infekčných komplikácií. Krátkodobý bezpečnostný profil rituximabu v chronickej liečbe je preto možné považovať za veľmi dobrý a jednoznačne vyšší ako je známy u tradičnej chemoterapie. Dlhodobá resp. kumulatívna toxicita rituximabu nie je známa a doposiaľ ani nebola popísaná. Veľmi dobrá tolerancia rituximabu a jeho bezpečnostný profil umožňujú, aby sa udržiavacia liečba podávala ambulantne.

**Slovensko patrí k prvým krajinám, v ktorých štátna zdravotná správa schválila rituximab (MabThera®) v indikácii udržiavacej liečby u pacientov s relabujúcim/refraktérnym FL, ktorí odpovedali na indukčnú liečbu s alebo bez MabThery®. Táto indikácia je schválená na Slovensku od 1.1.2007.** Všetci pacienti s FL, ktorí reagovali na indukčnú liečbu, tak môžu dostať udržiavaciu terapiu MabTherou® v dávke 375 mg/m<sup>2</sup> povrchu tela každé 3 mesiace až do progresie ochorenia alebo maximálne po dobu 2 rokov.

Tretia sekcia prednášok, ktorej predsedníctvo tvorili **MUDr. V. Ballová** a **MUDr. M. Ladická**, sa zaoberala problémom diagnostiky a liečby

transformovaného folikulového lymfómu, transplantáciám krvotvorných buniek v liečbe pacientov s FL a rádioimunoterapii FL.

### **Blastická transformácia folikulárneho lymfómu**

Napriek významným pokrokom v terapii FL v posledných 20 rokoch zostáva medián prežívania pri FL stále 8 až 9 rokov. Hlavnou príčinou mortality zostáva perzistencia reziduálneho ochorenia, povedal na úvod svojej prednášky **MUDr. J. Hudeček (JLF UK a MFN, Martin)**. Na začiatku celého procesu stojí **malígna bunka, ktorá v dôsledku inhibície apoptózy dlhodobo prežíva a ako proliferuje, rozrastá sa aj nádorový klon. Zo začiatku je táto nádorová populácia homogénna, ale jej genotyp sa stáva časom a rastom nádorovej populácie labilný, takže vznikajú subklony a subpopulácie (klonálna evolúcia), ktoré môžu časom prevládnúť a rozhodnúť o ďalšom priebehu ochorenia. Nové mutácie sa pritom nachádzajú už v indolentnej fáze ochorenia.** Genetická nestabilita a nehomogénnosť nádorovej populácie je pritom priamo úmerná jej veľkosti. Mutované klony majú na začiatku väčšiu proliferáciu a zmenenú alebo len obmedzenú citlivosť na protinádorovú liečbu. Bola popísaná celá rada mutácií, ktoré sa nachádzajú v 53 % transformujúcich sa FL a úplne chýbajú u indolentných lymfómov: **hypermütácia génov PIM-1, PAX-5, RhoH/TTF, c-MYC, inaktivácia génov p53, strata expresie, apod.** Transformácia sa pozoruje u všetkých indolentných FL lymfómov a je vždy len otázkou času a observácie, povedal MUDr. Hudeček. DLBCL je najčastejší typ sekundárneho agresívneho NHL a tvorí 25 – 30 % transformovaných FL a asi 5 % iných akútne transformovaných chronických lymfadenóz. Transformácia FL na DLBCL znamená z morfolologickej stránky stratu nodulárneho charakteru rastu, difúziu proliferáciu buniek a zvýšenú mitotickú aktivitu. O sekundárnom agresívnom NHL sa môže hovoriť len vtedy, ak sa popri nízko malígnej populácii buniek nájdú aj vysoko malígne komponenty a pacient v anamnéze udáva indolentný NHL. Riziko blastickej transformácie NHL sa zvyšuje v priamej závislosti na dĺžke trvania

ochorenia. V priebehu posledných 20 rokov sa uskutočnilo niekoľko klinických štúdií, ktoré sledovali incidenciu blastickéj transformácie indolentných NHL a rozpätie percentuálneho podielu sa pohybuje od 24 % (Bastion a kol.; medián sledovania 9 rokov) až po 40 % (Horning a Rosenberg; medián sledovania 8 rokov). Určenie incidencie závisí na celej rade faktorov (definícia, frekvencia a lokalizácia biopsií, dĺžka sledovania). Horningova krivka závislosti pravdepodobnosti blastickéj transformácie indolentného FL, ktorá sledovala pacientov 12 rokov, však predsa len dokazuje, že **blastická transformácia je najčastejšia v priebehu prvých 6 rokov, kedy krivka pravdepodobnosti transformácie strmo stúpa, ale približne po šiestich rokoch nastupuje plateau, ktoré vyjadruje, že frekvencia transformácie sa u dlhšie trvajúcich lymfómov významne znižuje** (Horning a kol., 1993). To, čo môže predpovedať riziko blastickéj transformácie a kratšie prežívanie je vysoká hladina  $\beta$ 2-mikroglobulínu v čase stanovenia diagnózy, nedosiahnutie kompletnej remisie po prvej línii liečby, vyšší podiel CD8+ T-lymfocytov, menšie množstvo reziduálnych nenádorových B-lymfocytov v tumore (Farinha a kol., 2006). Klinický obraz transformácie je charakteristický u väčšiny pacientov objavenia sa symptómov u predtým bezsymptómovo prebiehajúceho indolentného lymfómu – zvýrazia sa B-symptómy (chudnutie, potenie), progreduje periférna alebo centrálna LAP a/alebo sa objavuje organomegalia (splenomegalia, hepatosplenomegalia). V krvnom obraze sa objaví alebo zvýrazní anémia, trombocytopénia, nádorové bunky sa začínajú vyplavovať aj do periférnej krvi (leukemizácia) a zvýši sa hodnota LD ( $\geq$  trojnásobok normy), ktorá je úmerná veľkosti nádorovej masy. **Diagnostika transformácie FL sa opiera o opakované histologické vyšetrenie, pričom odporúča sa bioptizovať najväčšiu léziu alebo rýchlo rastúcu masu. V prípade dostupnosti PET sa odporúča biopsia z miesta s najvyššou PET aviditou** (Weissler a kol.). Nie je zriedkavosťou, že biopsia nemusí byť reprezentatívna v celom objeme nádoru a v takom prípade, ak trvá podozrenie na transformáciu, je nutné pacienta

rebioptizovať. Prognóza transformovaného FL je veľmi nepriaznivá. Medián prežívania je 7 – 22 mesiacov. **K prediktívnym faktorom prežívania patrí vek (čím vyšší, tým horšia prognóza), ďalej hladina laktátdehydrogenázy (LD), ktorá je úmerná mase tumoru a u sledovaného indolentného lymfómu supouje transformáciu, takže je súčasne aj indikáciou na rebiopsiu.** Ďalšími prognostickým faktormi sú **náhly vznik alebo zvýšenie intenzity B-symptómov, ale aj stupeň infiltrácie kostnej drene, včasná transformácia (do 2 rokov od stanovenia diagnózy).** Na druhej strane je priaznivým prognostickým faktorom **žiadna predchádzajúca chemoterapia alebo dobrá funkčná rezerva kostnej drene.** Odpoveď ochorenia na záchrannú terapiu je zase istým testom chemorezistencie ochorenia na prípadnú **intenzívnejšiu terapiu.** Liečba transformovaného folikulového lymfómu je problematická, pretože všeobecne sa pozoruje, že prežívanie bez príznakov ochorenia (DFS) po štandardnej chemoterapii je u transformovaného FL kratšie, ako po štandardnej chemoterapii primárneho DLBCL. Väčšina pacientov s transformovaným FL má obmedzenú kapacitu krvotvorby v dôsledku predchádzajúcej liečby, takže do úvahy nepripadajú žiadne agresívnejšie formy liečby, nakoľko hrozí fatálny dreňový útlm. V podstate je liečba podobná ako pri primárnom DLBCL. **Používajú sa režimy s doxorubicínom alebo s purínovými analógmi v kombinácii s imunoterapiou (rituximab).** U chemosenzitivných relapsov je výhodné **podat' vysoko dávkovú chemoterapiu v kombinácii s autológnu transplantáciou kmeňových buniek.** Po takejto liečbe **prežíva 5 rokov 50 % až 60 % pacientov.** Skúšajú sa aj tandemové autotransplantácie a alotransplantácie. Ak je infiltrácia kostnej drene  $\leq 25 \%$ , vysokú úspešnosť má imunorádioterapia ( $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab,  $^{131}\text{I}$ -tositumomab), ktorou sa dosiahne signifikantné predĺženie celkového prežívania v 50 % - 80 %. Rádioimunoterapia sa preto v súčasnosti ukazuje ako veľmi perspektívna modalita liečby transformovaného FL, u ktorého je ináč vo väčšine prípadov aj napriek konvenčnej liečbe prežívanie kratšie ako rok.

## **Rádioimunoterapia folikulového lymfómu**

O tejto novej liečebnej stratégii hovorila v prednáške **MUDr. M. Ladická (NOÚ, Bratislava)**. Prvýkrát bola oficiálne schválená v USA v roku 2002 ( $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab) v indikácii liečby relabujúceho, transformovaného alebo refraktérneho FL. V súčasnosti sú k dispozícii dve molekuly monoklonových protilátok s naviazanými rádioizotopmi -  $^{90}\text{Y}$ -**ibritumomab** (Tiuxetan®), a  $^{131}\text{I}$ -**tositumomab**. Tieto dve molekuly sa odlišujú fyzikálnymi vlastnosťami.  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab je beta žiarič (dĺžka žiarenia 5,3 mm, energia častíc 2,2 MeV), ktorý má polčas 2,6 dňa, distribuuje sa okrem nádoru aj v kostiach, ale denzitometrické vyšetrenie pred zahájením liečby nie je potrebné, pretože dávka je závislá od hmotnosti a počtu trombocytov. Môže sa podávať ambulantne, ale táto liečba je vysoká.  $^{131}\text{I}$ -**tositumomab** je beta aj gamma žiarič (dĺžka žiarenia 0,8 mm, energia beta častíc 0,6 MeV a gamma častíc 0,36 MeV), polčas rozpadu má 8,1 dňa, okrem nádorového tkaniva sa distribuuje aj v štítnej žľaze (vďaka obsahu molekuly jódu), denzitometrické vyšetrenie alebo zobrazovacie vyšetrenie pred zahájením liečby je potrebné, pretože dávka je závislá od biodistribúcie rádioaktívneho jódu. Aj keď sa u tejto molekuly pripúšťa ambulantná liečba, v USA, kde sa už používa v terapii spomínaných klinických jednotiek, sa preferuje ústavná liečba. Oproti  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabu má  $^{131}\text{I}$ -tositumomab tú výhodu, že jeho cena je relatívne nízka. MUDr. Ladická sa venovala aj toxicite oboch rádioimunopreparátov.  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab dosahuje pík toxických účinkov na kostnú dreň za 6-8 týždňov po podaní, najčastejšie komplikácie sú neutropénia G4 (30%), trombocytopénia G4 (10%), ťažké infekcie (7%) a ostatné toxické dopady na kostnú dreň (anémia, krvácanie, MDS AML, HAMA). U  $^{131}\text{I}$ -tositumomabu sa **pozoruje maximálny pokles hematologických parametrov za 4-6 týždňov a jeho hematologická toxicita je nižšia ako  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabu. Výskyt myelodysplastického syndrómu a AML je u oboch preparátov porovnateľný. Doteraz neboli zverejnené žiadne porovnávacie štúdie, ktoré by porovnali klinickú účinnosť oboch**

**preparátov.** Boli však publikované jednotlivé práce autorov, ktorí už tieto preparáty používajú u ťažko predliečených pacientov. Podľa nich sa ukazuje, že celková liečebná odpoveď (ORR) po  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabe je vyššia (78-83 % versus 56%) a klinická odpoveď (CR) je tiež mierne vyššia po  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabe (44-51% versus 30%). **Efekt liečby  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabom je sa ukazuje vyšší najmä u pokročilých a „bulky“ štádií FL** (Wiseman a kol., Gordon a kol., Fischer a kol.). Keďže z predstavených monoklonových protilátok je v Európe dostupný zatiaľ len  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab, venovala sa MUDr. Ladická v zvyšnej časti svojej prednášky tomuto produktu. Mechanizmus jeho účinku spočíva v selektívnom naviazaní monoklonovej protilátky na nádorové bunky, pričom žiarenie naviazaného rádioizotopu zasahuje nielen bunku, na ktorej sa monoklonová protilátka naviazala, ale vzhľadom na dosah žiarenia pôsobí aj na okolité bunky, t.j. v prípade „bulky“ ochorenia, pri zlom prekrvení tumoru alebo pri heterogénnej expresii antigénu beta žiarenie pôsobí na všetky smery aj do hĺbky nádoru, kam sa samotná protilátka nemusí dostať. Tomuto výhodnému efektu sa hovorí „efekt skríženej paľby“ („**crossfire effect**“). **Liečebná schéma spočíva v podaní rituximabu (250 mg/m<sup>2</sup>) v prvý deň spoločne s  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabom (0.4 mCi/kg u pacientov s  $\text{Tr} \geq 150\,000/\mu\text{l}$ , alebo 0.3 mCi/kg u pacientov s počtom  $\text{Tr}$  100 000-149 000/ $\mu\text{l}$ . Podaním rituximabu krátko pred podaním radioimunofarmaka sa sleduje zlepšenie biodistribúcie  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabu, nakoľko rituximab vyviaže periférne voľne cirkulujúce CD20+ bunky.** Podobná dávka oboch preparátov sa podá na ôsmy deň. Kontraindikáciou podania Tiuxetanu® je infiltrácia  $\text{KD} > 25\%$ ,  $\text{RAT} > 25\%$  aktívnej kostnej drene,  $\text{Tr} < 100\,000$  a  $\text{Le} < 1,5$  tisíc. Kontraindikáciou sú aj pacienti po transplantácii kostnej drene. V súčasnosti sú publikované **výsledky dvoch významných prác, ktoré sa týkajú použitia  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabu v liečbe relapsovaného NHL-B a FL. Ide o fázy I/II klinických štúdií.** V prvej štúdií bolo zaradených 37 pacientov (28 s FL). Celková odpoveď na liečbu bola u FL (ORR) 85 %, v celom súbore bola ORR

73 %, pričom kompletne remisie sa dosiahli až u polovice pacientov. Medián času do progresie (TTP) pre respondentov bol 12,6 mesiacov. V druhej štúdií bolo zaradených 30 pacientov (25 FL), celková odpoveď na liečbu u FL (ORR) bola 92%, v celom súbore bola ORR 83 %. Kompletne remisie sa dosiahli len v 32 % a medián času do progresie ochorenia bol u respondentov s FL podobný ako v prvej štúdií (12,6 mesiacov). **Pri porovnaní klinickej účinnosti  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabu (0.4 mCi/kg max 32 mCi) s rituximabom (375 mg/m<sup>2</sup> 4x á týždeň) v liečbe relapsovaného NHL-B, vrátane FL, sa síce dosiahli krátkodobo lepšie výsledky po  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabe, a to v ORR (86 % versus 55 %, p=0.002) a CR (30 % versus 16 %, p=0.04), ale v celkovom čase do progresie (TTP) u všetkých pacientov (n=143) aj u pacientov s FL (n=113) sa nezistili žiadne signifikantné rozdiely medzi oboma liečebnými modalitami, rovnako ako sa nedokázali štatisticky významné rozdiely ani v dopade na celkové prežívanie.** Významný prínos  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabu sa nedokázal ani v liečbe rituximab refraktérnych pacientov, kde síce dosiahol 74 % odpovedí, ale medián TTP bol 6,8 mesiaca (pre responderov 8,7 mesiaca). Skúšalo sa aj jeho použitie v prvej línii liečby FL (n=10) v dávke  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabu 0.3-0.4 mCi/kg, po ktorom nasledovalo klasické dávkovanie rituximabu (375 mg/m<sup>2</sup> 4x á 6 mesiacov). Z celkového počtu 10 pacientov bolo hodnotených len 8, z toho 5 mali v čase zaradenia IV. klinické štádium. Kompletná remisia (CR) sa dosiahla u 62 % a parciálna (PR) u 38 %. Keďže ide o novú molekulu, do istej miery sa optimálne terapeutické režimy ešte len hľadajú. Aj keď sa dá predpokladať synergický účinok rádioimunoterapie s chemoterapiou, musí sa brať do úvahy aj ich „synergický“ toxický účinok na kostnú dreň, t.j. maximálny pokles hematologických parametrov po  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab je za 6-8 týždňov, čo znamená, že ďalšia myelotoxická liečba (CHT) je možná až po 2-3 mesiacoch. Do úvahy preto pridá režim, v ktorom sa na prvom mieste podá jedna kúra chemoterapie, následne rádioimunoterapia a s chemoterapiou sa pokračuje až po 12 týždňoch po úprave hematologických

parametrov. Na druhom mieste je možné podať v prvej línii chemoterapiu a rádioimunoterapiu v konsolidácii. Výhodou tohto režimu je to, že v čase podania  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabu sú už krvné parametre v norme, čo súvisí s cytoredukciou po chemoterapii a menším postihnutím kostnej drene a to umožňuje pokles intenzity aj dĺžky trvania cytopénie po  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabe. Zdá sa tiež, že tento režim by mohol viesť aj k redukcii počtu cyklov chemoterapie. Predpokladá sa, že použitie rádioimunoterapie v prvej línii môže výrazne znížiť incidencia myelodysplázie po indukčnej liečbe a zvýšiť podiel kompletných remisií. Skúmajú sa však ešte ďalšie režimy, napríklad vysokodávková rádioimunoterapia s následným podaním vysoko dávkovanej chemoterapie (alebo bez nej) s následnou auto- alebo alotransplantáciou kostnej drene. V závere svojej prednášky autorka uviedla vlastné skúsenosti s liečbou  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomabom v prvom súbore slovenských pacientov. Aj keď išlo o rozsahom veľmi malý súbor, zaujímavé je, že dvakrát sa táto liečba použila aj u pacientov po transplantácii kostnej drene (24 a 42 mesiacov), ktorá sa všeobecne považuje za kontraindikáciu rádioimunoterapie. U týchto pacientov sa však napriek tomu nedokázala počas rádioimunoterapie ani po nej horšia hematologická toxicita, ako u netransplantovaných. Všetci pacienti v slovenskom súbore mali klinické štádium FL IV. U 4 z týchto pacientov sa dosiahla kompletná remisia a u dvoch parciálna, medián prežívania bol 12 mesiacov, ale celkové závery sú skreslené malým počtom zaradených pacientov. MUDr. M. Ladická si myslí, že  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetan má zvládnuteľnú toxicitu, jasnú efektívnosť aj u predliečených pacientov s FL a je ho možné použiť aj po autotransplantácii kostnej drene, alebo u pacientov s FL, ktorí relapsovali alebo nereagovali na liečbu Mabtherou®.

V poslednej sekcii prednášok venovaných vlastným skúsenostiam českých (MUDr. T. Papajík, Olomouc) a slovenských autorov (MUDr. V. Ballová, MUDr. J. Marcinek, MUDr. P. Szépe, MUDr. J. Chudej, MUDr. A. Vranovský, MUDr. Balhárek) odznela aj prehľadná prednáška MUDr. Veroniky Ballovej

(NOÚ, Bratislava) o klinických štúdiách u pacientov s FL, ktoré prebehli na Slovensku.

### **Prehľad klinických štúdií pacientov s FL**

Ako prvú spomenula **MUDr. V. Ballová (NOÚ, Bratislava) štúdiu 26866138-LYM-3001**, ktorej primárnym cieľom je zistiť, či kombinácia **Velcade® + rituximab je účinnejšia ako rituximab v monoterapii u pacientov s FL G 1,2 s relabujúcim alebo refraktérnym ochorením, alebo s progresiou FL po predchádzajúcej CHT**. Obe liečebné stratégie sa hodnotili z hľadiska PFS ako primárneho cieľa, sekundárnymi cieľmi bolo zistenie ORR (CR+CRu+PR), CR, trvanie odpovede, TTP, OS a jednoročné OS. Taktiež sa sledovala bezpečnosť a tolerancia kombinovanej liečby a v rámci výskumu sa ukutočnili aj odbery biomarkerov, aby sa bližšie špecifikovala skupina senzitivných pacientov. Do štúdie boli zaradení pacienti s už spomínanými stupňami FL (G1, G2, relabujúci/refraktérny FL, po  $\geq 1$  línii CHT, +/- rituximab v minulosti). Pacienti, ktorí v minulosti dostali rituximab, museli mať dokázanú senzitivitu, t.j. v minulosti museli dosiahnuť aspoň parciálnu remisiu, ktorá trvala minimálne 6 mesiacov. Do štúdie boli zaradení pacienti s merateľným ochorením a bez postihnutia CNS. Medzi vylučujúce kritériá patrila iná malignita alebo už spomínaná v minulosti dokázaná rezistencia na rituximab. Štúdia mala dve ramená. V prvom ramene dostávali pacienti v 35-dňovom cykle Velcade® 1,6 mg/m<sup>2</sup> D 1,8,15,22 a rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> D 1,8,15,22 v prvom cykle a D 1/2-5 v druhom cykle. V druhom ramene pacienti dostávali len rituximab v rovnakej schéme ako v prvom ramene (t.j. rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> D1,8,15,22 v prvom cykle a D1/2-5 v druhom cykle). Táto štúdia sa uskutočňuje na dvoch pracoviskách – v Martine a v Košiciach. Druhá štúdia, ktorá práve prebieha v NOÚ Bratislava je **štúdia SAKK 35/03**, ktorá skúma efektívnosť udržiavacej liečby Mabtherou® počas 2 rokov alebo do progresie (< 5 rokov). V rámci vstupných kritérií sú zaradení pacienti s FL G1, G2, 3a (WHO klasifikácia), vo veku > 18 rokov, CD 20+. Ide o pacientov tak s neliečeným FL, ako aj

pacientov s relabujúcim / refraktérnym FL alebo s progresiou po predchádzajúcej chemoterapii. Do štúdie mohli byť zaradení pacienti aj bez predchádzajúcej liečby rituximabom. Ak v minulosti rituximab dostávali, museli mať dokázanú senzitivitu na imunoterapiu a od posledného podania rituximabu musel uplynúť aspoň rok. Taktiež medzi zaraďovacie kritériá patrili merateľnosť ochorenia a chýbanie postihnutia CNS. Vylučujúce kritériá boli opäť iná malignita alebo FL rezistentný na rituximab. **Hlavným cieľom štúdie je sledovanie prežívania bez relapsu (EFS)** a štúdia má aj niekoľko sekundárnych cieľov – sledovanie ORR (CR+CRu+PR), CR, PFS, OS **a najmä zistenie bezpečnosti a tolerancie prolongovanej udržiavacej liečby rituximabom. Očakávaným výsledkom je aj podiel dosiahnutých molekulárnych remisií (MR) a ich trvanie.** Schéma štúdie spočíva v indukčnej liečbe sólo rituximabom 375 mg/m<sup>2</sup> týždenne, spolu štyrikrát. Ak dosiahnu po indukčnej liečbe remisiu (parciálnu alebo kompletnú), sú pacienti randomizovaní do ramena s **krátkou udržiavacou liečbou** (rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> každé 2 mesiace x 4) alebo **dlhodobou udržiavacou liečbou** (375 mg/m<sup>2</sup> každé 2 mesiace až do relapsu). Treťou prebiehajúcou štúdiou je **štúdia MAXIMA, ktorej primárnym cieľom je zistiť bezpečnosť udržiavacej liečby rituximabom po indukčnej liečbe s rituximabom** (1. línia liečby alebo liečba relapsu FL s dosiahnutím kompletnej alebo parciálnej odpovede). K sekundárnym cieľom patrí sledovanie PFS, EFS, TNLT (čas do nasledujúcej liečby), konverzia parciálnej na kompletnú remisiu a kompletne remisie počas udržiavacej liečby. Štúdia prebieha na 3 slovenských pracoviskách – v Martine, Košiciach a v NOÚ v Bratislave. K vstupným kritériám patrí diagnostikovaný FL G1, 2, 3a (WHO kritériá), vek ≥ 18 rokov, ukončená štandardná indukčná liečba (8x rituximab +/- chemoterapia) s CR, Cru alebo PR, merateľná choroba, neprítomnosť CNS postihnutia. Medzi vylučovacie kritériá patrí iná malignita, rezistentný FL, HIV infekcia, hepatitída B alebo C, resp. iná chronická aktívna infekcia. Dizajn štúdie je založený na podávaní rituximabu 375 mg/m<sup>2</sup> každé 2

mesiace počas 2 rokov. O všetkých spomínaných štúdiách a priebežných výsledkoch bude Lymfómová skupina informovať na svojej webovej stránke.

**MUDr. Katarína Bánska**

**Foto autorka**