

Dosažení Bcl-2/IgH negativity v periferní krvi/kostní dřeni po léčbě je u nemocných s folikulárním lymfomem spojeno s lepší prognózou onemocnění

D. Belada¹, L. Smolej¹, P. Štěpánková¹, M. Beránek², D. Dvořáková³, J. Bukač⁴, J. Malý¹

¹ Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

² Ústav klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc.

³ Centrum molekulární biologie a genové terapie Interní hematologické kliniky Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

⁴ Ústav lékařské biofyziky Lékařské fakulty UK Hradec Králové, přednosta doc. Ing. Josef Hanuš, CSc.

Souhrn: Bcl-2/IgH přestavba je charakteristickou molekulární přestavbou u nemocných s folikulárním lymfomem (FL), její prognostický význam je však stále nejasný. *Cíl práce:* Zhodnocení významu dosažení Bcl-2/IgH negativity na prognózu nemocných s FL. Samotnou chemoterapií (CHT) bylo léčeno 27 nemocných (54 %), chemoterapií v kombinaci s monoklonální protilátkou anti-CD20, rituximabem (R-CHT) 23 pacientů (46 %). *Výsledky:* Molekulárně genetické remise po R-CHT dosáhlo 7 z 11 pacientů (64 %), po CHT jen 2 ze 14 pacientů (14 %) – tento rozdíl byl statisticky významný ($p = 0,037$). U 17/27 nemocných, kteří byli léčeni samotnou chemoterapií a nedosáhli kompletní remise, byly podány sekvenčně 4 dávky rituximabu po 1 týdnu. 12 ze 17 nemocných (71 %) takto léčených bylo před léčbou Bcl-2/IgH pozitivních. K vymizení Bcl-2/IgH positivity došlo při kontrole za 1 měsíc u 7/12 nemocných (58 %), u 2/5 zbývajících nemocných byla zaznamenána negativita Bcl-2/IgH v intervalu 3 (1 pacient), resp. 6 měsíců (1 pacient). S dosažením Bcl-2/IgH negativity kdykoliv během léčby byly asociovány tyto faktory: věk < 65 let ($p = 0,02$) a performance status 0 + 1 dle WHO v úvodu ($p = 0,02$). Nemocní, kteří dosáhli vymizení Bcl-2/IgH po léčbě, měli v porovnání se skupinou Bcl-2/IgH pozitivních nižší riziko relapsu/progrese – 27 % vs 75 % ($p = 0,03$), ve 2 letech pak vyšší pravděpodobnost přežití bez progrese – 81 % vs 38 % ($p = 0,004$), bez události – 74 % vs 38 % ($p = 0,01$) a hraničně celkové přežití – 87 % vs 74 % ($p = 0,05$). *Závěr:* Dosažení Bcl-2/IgH negativity po léčbě folikulárního lymfomu je dle našich zkušeností spojeno s lepší prognózou onemocnění.

Klíčová slova: Bcl-2/IgH – folikulární lymfom – minimální reziduální nemoc – rituximab – prognóza

Achieving Bcl-2/IgH negativity in peripheral blood/bone marrow after therapy implies better prognosis for patients with follicular lymphoma

Summary: Bcl-2/IgH rearrangement is a characteristic molecular rearrangement in patients with follicular lymphoma (FL), yet its prognostic significance is still unclear. *Objective:* Evaluation of the implications of achieving Bcl-2/IgH negativity for the prognosis of FL patients. Twenty seven patients (54 %) were receiving only chemotherapy (CHT), 23 patients (46 %) were receiving chemotherapy combined with monoclonal antibody anti-CD20, rituximab (R-CHT). *Results:* Molecular genetic remission was achieved in 7 out of 11 patients (64 %) after R-CHT, and only in 2 out of 14 patients (14 %) after CHT – this difference was statistically significant ($p = 0.037$). 4 weekly doses of rituximab were administered in a sequence to 17 out of 27 patients who had received only chemotherapy and failed to achieve complete remission. 12 out of 17 patients (71 %) on this therapy were Bcl-2/IgH positive prior to treatment. 7 out of 12 (58 %) patients were no longer Bcl-2/IgH positive in a check performed after one month; the remaining 2 out of 5 patients had a negative Bcl-2/IgH record for the interval of 3 months (1 patient) or 6 (1 patient) months, respectively. The following factors were associated with the achievement of Bcl-2/IgH negativity at any point during the treatment: age < 65 years ($p = 0.02$) and performance status 0 + 1 according to WHO at baseline ($p = 0.02$). Patients who were Bcl-2/IgH negative after treatment had a lower recurrence/progression risk rate than the Bcl-2/IgH positive group of patients, i.e. 27 % vs. 75 % ($p = 0.03$), and a higher chance for progression-free survival, i.e. 81 % vs. 38 % ($p = 0.004$), event-free survival, i.e. 74 % vs. 38 % ($p = 0.01$), and overall survival, i.e. 87 % vs. 74 % ($p = 0.05$) at 2 years. *Conclusion:* In our experience, achieving Bcl-2/IgH negativity after follicular lymphoma therapy implies a better prognosis.

Keywords: Bcl-2/IgH – follicular lymphoma 2 minimum residual disease – rituximab – prognosis

Úvod

Folikulární lymfom (FL) je druhý nejčastější non-Hodgkinův lymfom (NHL) v západní populaci – v Evropě tvoří asi 20–25 % NHL u dospělé populace

[7]. Medián věku v době prezentace je asi 60 let [2]. Maligní buňky nesou až v 90 % translokaci t(14;18). Tato translokace z molekulárně genetického hlediska zahrnuje lokus 18q21 (obsa-

hující gen Bcl-2), který je translokován do oblasti lokusu 14q32, který kóduje těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) za vzniku fúzního genu Bcl-2/IgH [22]. Samotný gen Bcl-2 zůstává po

Tab. 1. Hlavní klinické charakteristiky souboru 50 pacientů s folikulárním lymfomem.

	Počet pacientů (N = 50)	%
Pohlaví		
Muži	33	66
Ženy	17	34
Věk > 65 let	12	24
Grade lymfomu		
1 + 2	43	86
Stadium		
I	3	6
II	5	10
III	4	8
IV	38	76
B symptomy	18	36
Performance status dle WHO		
0–1	42	84
2 a více	8	16
LDH > norma	29	58
β-2-mikroglobulin > norma	26	52
Lymfatické uzliny > 5 cm	5	10
Extranodální postižení (mimo dřeň)	10	20
Postižení dřene	37	74
FLIPI		
0–1 (nízké riziko)	19	38
2 (střední riziko)	15	30
3–5 (vysoké riziko)	16	32

translokaci strukturálně nezměněn. Translokace vzniká pravděpodobně chybou během procesu přestavby genů pro těžký řetězec imunoglobulinu ve stadiu pre-B lymfocytu v době, kdy dochází k přestavbě D a J genových segmentů oblasti IgH [3]. Bcl-2 onkogen se tak dostává do oblasti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu, což vede k jeho nadměrné expresi, a tím ke zvýšené syntéze proteinu Bcl-2 – mohutného inhibitoru apoptózy [22]. Tím je vysvětlena skutečnost, že buňky folikulárního lymfomu jsou „nesmrtelné“. Růst nádoru je v tomto případě více způsoben prodlouženým přežitím lymfomových buněk než zvýšenou proliferací aktivitou.

Význam minimální reziduální nemoci (MRN) u nemocných s FL v prognóze onemocnění byl studován mnoha autory s rozporupnými výsledky. Některé studie ukazují, že vymizení Bcl-2/IgH přestavby po léčbě je spojeno s redukcí rizika relapsu onemocnění,

a podporují tak myšlenku monitorování MRN [1,8]. Některé studie dokonce poukazují na skutečnost, že jedinci Bcl-2/IgH negativní po autologní transplantaci mají nejen delší období bez progresu lymfomu, ale i lepší celkové přežití oproti skupině s přetrvávající Bcl-2/IgH pozitivitou [14]. Nevýhodou vysokodávkované terapie je riziko sekundárních malignit (zejména myelodysplastického syndromu nebo akutní myeloidní leukemie), proto se pozornost v otázce eradikace MRN upírá na oblast imunoterapie – monoklonálních protilátek. Nejvíce zkušeností je s monoklonální protilátkou anti CD20 – rituximabem. Tato chimerická protilátka je tvořená lidským imunoglobulinem třídy IgG1 κ s myšími variabilními oblastmi izolovanými z myši anti-CD20 monoklonální protilátky IDEC-2B8 [19]. Váže se na CD20 antigen na povrchu B-lymfocytů, včetně buněk lymfomových. Podání rituximabu vedlo u části pacientů k dosa-

žení molekulárně genetické remise, tedy konverze z PCR positivity Bcl-2/IgH do PCR negativity [20]. Příznivý efekt rituximabu na dosažení molekulární remise prezentovali i olomoučtí autoři [16]. Cílem naší práce bylo zhodnocení významu dosažení molekulárně genetické remise pomocí nested PCR po podání chemoterapie (CHT), chemoterapie s rituximabem (R-CHT) a chemoterapie s následným sekvenčním podání rituximabu jako konsolidační léčby u skupiny nemocných, kteří po samotné chemoterapii nedosáhli kompletní remise a zůstali Bcl-2/IgH pozitivní. Porovnávali jsme skupiny pacientů Bcl-2/IgH negativních a pozitivních po léčbě s cílem zjistit, zda dosažení molekulárně genetické remise ovlivnilo prognózu onemocnění.

Pacienti a metody

Od června roku 2002 do ledna roku 2005 bylo do sledování zařazeno 50 nemocných léčených pro folikulární lymfom na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky LF UK a FN Hradec Králové. V souboru bylo 33 mužů a 17 žen, věkový medián byl 56,5 let (rozmezí 33–76). Vstupní klinické stadium I/II/III/IV dle Ann Arbor klasifikace bylo u 3/5/4/38 nemocných. Histologicky byl prokázán v lymfatické uzlině FL grade 1/2/3 u 17/26/6 pacientů, v jednom případě nebyl grade určen. Ve většině případů se jednalo o nově diagnostikované onemocnění (43 pacientů), u 7 nemocných pak o relaps. Vstupní prognostický FLIPI index (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) pro nízké/střední/vysoké riziko byl u 19/15/16 nemocných, B symptomy mělo 36 % pacientů, vstupní performance status dle WHO 0/1/2 byl u 11/31/8 pacientů. Postižení kostní dřene měla většina nemocných (74 %). Hlavní klinické charakteristiky souboru jsou shrnuty v tab. 1.

27 pacientů bylo léčeno chemoterapií (CHOP, COP), 23 chemoterapií s rituximabem (R-CHOP, R-COP, R-FND) – složení chemoterapií je uvedeno v tab. 2. U 17/27 (52 %) nemocných,

kteří byli léčeni samotnou chemoterapií, u nichž však nebylo dosaženo kompletní remise onemocnění, byl podán rituximab 4krát 375 mg/m² v týdenních intervalech s cílem odstranit reziduální nemoci. Celkem 12/17 (71 %) nemocných takto léčených bylo v době před léčbou Bcl-2/IgH pozitivních. U této podskupiny bylo sledováno, zda po podání rituximabu došlo k vymizení Bcl-2/IgH positivity a při jejím přetrvávání bylo vyšetření opakováno ještě po 3 a 6 měsících. Molekulárně genetická odpověď na léčbu byla hodnocena u 25 nemocných (1 zemřel při léčbě). U všech vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných byly vyšetřeny vzorky periferní krve i kostní dřeně před léčbou i po jejím skončení. U nemocných v molekulárně genetické remisi bylo hodnoceno, zda dosažení remise ovlivnilo prognózu onemocnění ve vztahu k delšímu celkovému přežití (OS), přežití bez známek progresu (PFS) a přežití bez události (EFS) oproti skupině nadále Bcl-2/IgH pozitivních. Léčebná odezva byla hodnocena dle standardních Chesonových kritérií [10].

DNA extrakce a analýza

DNA ze vzorků periferní krve a kostní dřeně byla extrahována fenol-chloroformovou extrakcí po inkubaci 200 µl vzorku s proteinázou K při 56 °C po dobu 16 hod nebo pomocí komerčních mikrokolonek (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, SRN) dle doporučení výrobce. Pro amplifikaci byla použita dvoukolová nested PCR. Produkty definované pomocí systému zevních a vnitřních primerů zahrnovaly oblasti major breakpoint region (MBR) a minor cluster region (mcr) na chromozomu 18. Sekvence primerů byly převzaty z práce Gribbena et al [9]. Obě PCR reakce byly provedeny v 25 µl reakční směsi obsahující: 150 ng nebo 500 ng DNA (v PCR I reakci) nebo 1 µl PCR I produktu (PCR II reakce), 2,5 µl 10krát PCR pufru (TaKaRa Shuzo, Otsu, Shiga, Japonsko), 200 µM koncentraci každého dNTP (TaKaRa),

Tab. 2. Schéma použitých chemoterapeutických režimů.

(R)-CHOP: (rituximab 375 mg/m²) IV D1, cyklofosamid 750 mg/m² IV D 1, doxorubicin 50 mg/m² IV D 1, vinkristin 1,4 mg/m² IV D 1 (maximum 2 mg), prednison 100 mg PO D 1–5

(R)-COP: (rituximab 375 mg/m²) IV D1, cyklofosamid 750 mg/m² IV D 1, vinkristin 1,4 mg/m² IV D 1 (maximum 2 mg), prednison 40 mg/m² PO D 1–5

R-FND: rituximab 375 mg/m² IV D1, fludarabin 25 mg/m² IV D1–3, mitoxantron 10 mg/m² IV D 1, dexametazon 20 mg PO D 1–5

0,8 µM koncentraci primerů, 2 mM chloridu hořečnatého a 1 U Taq polymerázy (TaKaRa). Amplifikace byla provedena v termocykléru GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Po úvodní denaturaci (5 min při 96 °C) proběhly PCR I and PCR II reakce v 30 reakčních cyklech: 60 sekund denaturace při 95 °C, 60 sekund annealing při 60 °C a 60 sekund polymerace při 72 °C. Detekce PCR produktů byla provedena pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu s etidiumbromidem.

Statistická analýza

Všichni nemocní zařazení do sledování podepsali informovaný souhlas. Sledovanými parametry byly: celkové přežití, které bylo definováno jako období od zahájení terapie do úmrtí nemocného nebo ztráty ze sledování, dále období do progresu, které bylo určeno jako doba od zahájení léčby do relapsu/progresu onemocnění. Za událost byla považována progresu/relaps lymfomu, zahájení další protinádorové léčby nebo úmrtí z jakékoliv příčiny. K porovnání shody vstupních charakteristik souboru nemocných bylo použito Fisherova přesného testu, křivky přežití byly vytvořeny dle metody Kaplan a Meiera [11], shoda křivek byla testována log rank testem.

Výsledky

Klinická a molekulární odpověď po léčbě chemoterapií a imunochemoterapií

Ve skupině 50 nemocných zařazených do sledování byla zjištěna Bcl-2/IgH

pozitivita z periferní krve a/nebo kostní dřeně pomocí PCR u 26 (52 %), zbývajících 24 nemocných (48 %) bylo Bcl-2/IgH negativních. Z 26 nemocných Bcl-2/IgH pozitivních před léčbou se ve 24 případech (92 %) jednalo o přestavbu v oblasti major breakpoint region (MBR), u 2 pacientů (8 %) pak v oblasti minor cluster region (mcr). 27 pacientů bylo léčeno samotnou chemoterapií (CHT), 23 chemoterapií v kombinaci s rituximabem (R-CHT). Z 27 nemocných po podání CHT bylo 25 hodnotitelných (2 nemocní zemřeli během léčby), u 21 z nich byla zaznamenána klinicky léčebná odpověď (84 %), z toho u 7 nejistá kompletní remise (uCR) a kompletní remise (CR) – 28 %, u 14 pak parciální remise (PR) – 56 %. 4 nemocní nezareagovali na léčbu – hodnoceni jako stabilní onemocnění (SD). Ze 14 Bcl-2/IgH informativních nemocných z této podskupiny dosáhli vymizení Bcl-2/IgH přestavby po CHT jen 2 nemocní (14 %), v 1 případě se jednalo o pacienta v CR, u 1 v parciální remisi. Ze 23 nemocných léčených kombinací rituximabu a chemoterapie (R-CHT) bylo 21 klinicky hodnotitelných (2 nemocní zemřeli při léčbě). CR + uCR dosáhlo 15 z 21 pacientů (71 %), u 4 bylo dosaženo PR (19 %), 2 nemocní nedosáhli léčebné odezvy, efekt léčby hodnocen jako SD. Celková léčebná odpověď v této skupině byla 90 %. Z molekulárního hlediska ze skupiny 11 pacientů Bcl-2/IgH pozitivních dosáhlo molekulární remise po R-CHT 7 nemocných (64 %), z toho 6 bylo v uCR + CR, jeden v PR. Porovnáním

Tab. 3. Klinická a molekulární odpověď po chemoterapii (CHT) a chemoterapii s rituximabem (R-CHT).

Klinická odpověď	N	%	před léčbou PCR +	po léčbě PCR +	po léčbě PCR –
po podání CHT:	25		N = 14		
uCR + CR	7	28		2/3	1/3
PR	14	56		8/9	1/9
SD	4	16		2/2	0/2
Celkem				12/14	2/14 (14 %)
po podání R-CHT:	21		N = 11		
uCR + CR	15	71		2/8	6/8
PR	4	19		1/2	1/2
SD	2	10		1/1	0/1
Celkem				4/11	7/11 (64 %)

obou skupin bylo zjištěno, že nemocní léčení R-CHT dosáhli statisticky významně více molekulárních remisí než pacienti léčení samotnou CHT (64 % vs 14 %, $p = 0,037$). Z klinického pohledu nemocní po R-CHT dosáhli významně vyššího procenta uCR + CR oproti skupině léčené samotnou CHT (71 % vs 28 %, $p = 0,007$). Výsledky klinické a molekulární odpovědi skupiny léčené CHT i R-CHT jsou shrnuty v tab. 3.

Klinická a molekulární odpověď na sekvenční podání rituximabu po chemoterapii

Sekvenčně byl podán rituximab u 17 ze 27 nemocných, kteří byli léčení samotnou chemoterapií, ale u kterých nebylo dosaženo kompletní remise onemocnění s přetrvávající Bcl-2/IgH pozitivitou. Z klinického pohledu bylo před podáním rituximabu ze 17 nemocných 14 v parciální remisi a 3 v nejisté kompletní remisi. Rituximab byl podán ve standardním dávkování, tedy 4krát 375 mg/m² po 1 týdnu s cílem odstranění reziduální nemoci. Po podání rituximabu 8 ze 14 nemocných původně v PR dosáhlo CR, 2 pak uCR a 4 zůstali v PR. Všichni 3 nemocní, kteří byli hodnoceni jako uCR před podáním rituximabu, dosáhli poté CR. Celkem u 13/17 (76 %) nemocných došlo ke zlepšení celkové odpovědi po podání 4 dávek rituximabu. Z molekulárně genetického hlediska

celkem 12/17 (71 %) nemocných bylo pozitivních na přestavbu Bcl-2/IgH před sekvenčním podáním rituximabu. K vymizení Bcl-2/IgH positivity došlo při kontrole za 1 měsíc od poslední dávky rituximabu u 7/12 nemocných (58 %). Zbývajících 5 Bcl-2/IgH pozitivních pacientů bylo poté sledováno po 3 měsících a u 2 z 5 došlo k vymizení Bcl-2/IgH přestavby v intervalu 3 (1 pacient), resp. 6 měsíců (1 pacient), což ukazuje na dlouhodobý biologický efekt podávaného rituximabu. Molekulárně genetická odpověď byla zaznamenána u 9/12 nemocných z této skupiny (75 %).

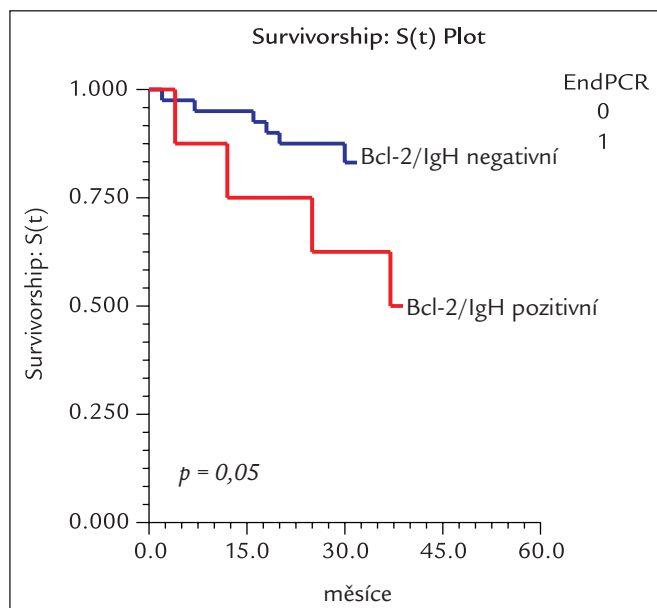
Záchyt Bcl-2/IgH v jednotlivých kompartmentech před léčbou a po léčbě

U 23 ze 26 vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných bylo diagnostikováno postižení obou kompartmentů současně (ve 21 případech MBR, u 2 nemocných mcr). U dvou pacientů byla Bcl-2/IgH pozitivita kostní dřeni při negativitě Bcl-2/IgH v periferní krvi, u 1 nemocného byl naopak záchyt Bcl-2/IgH elementů jen v periferní krvi při negativním nálezu v kostní dřeni. Po léčbě samotnou chemoterapií zůstalo 14 pacientů Bcl-2/IgH pozitivních v periferní krvi a/nebo v kostní dřeni, po podání rituximabu s chemoterapií 4 nemocní – celkem tedy u 18 nemocných byla zkoumána korelace mezi nálezy v kostní dřeni a pe-

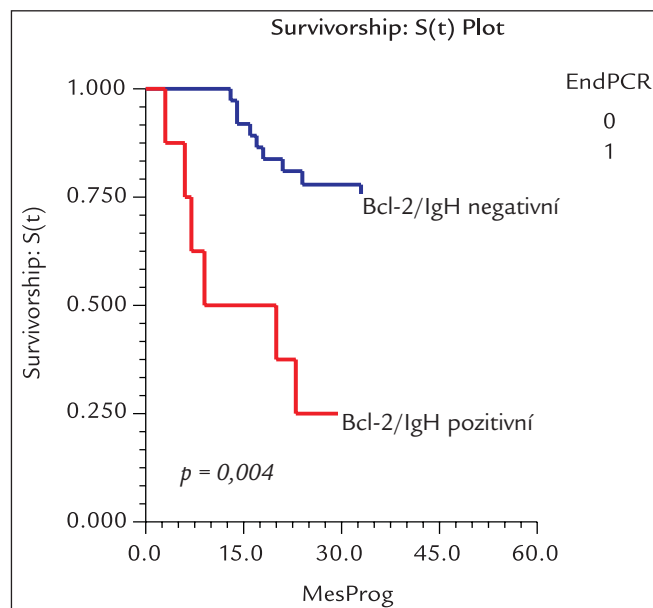
riferní krvi i po léčbě. U 11 z 18 nemocných (61 %) byla nalezena Bcl-2/IgH pozitivita v obou kompartmentech, 5 z 18 nemocných bylo Bcl-2/IgH negativních v periferní krvi s přetrvávající pozitivitou ve dřeni a naopak 2 z 18 nemocných dosáhli vymizení Bcl-2/IgH v periferní krvi, ale přetrvávala u nich pozitivita v periferní krvi. Onemocnění se tak jeví více rezistentní k léčbě v kostní dřeni než v periferní krvi.

Význam dosažení Bcl-2/IgH negativity na prognózu onemocnění

Ze souboru 26 nemocných vstupně Bcl-2/IgH pozitivních ke dni hodnocení zemřelo 5 nemocných – všichni na progresi lymfomu, 3 z nich byli ze skupiny, která nedosáhla nikdy Bcl-2/IgH negativity. Následný relaps/progrese lymfomu byly po léčbě zaznamenány u 10 ze 23 (43 %) hodnotitelných pacientů (3 nemocní zemřeli během léčby) s mediánem doby do relapsu/progrese 15,5 měsíce. U skupiny, kde během léčby v kterékoli fázi bylo dosaženo Bcl-2/IgH negativity, došlo k relapsu u 4/15 pacientů (27 %), u nadále Bcl-2/IgH pozitivních pak u 6/8 případů (75 %) – tento rozdíl byl statisticky významný ($p = 0,03$). Medián OS u celé skupiny 26 vstupně Bcl-2/IgH pozitivních nemocných nebyl dosažen, 3. kvartil byl 37 měsíců. Ke dni hodnocení žije 21/26 nemocných (81 %), ve skupině nadále Bcl-2/IgH pozitivních žije 4/8 nemocných (50 %), ve skupině Bcl-2/IgH negativních žije 17/18 pacientů (94 %). Pravděpodobnost 2letého přežití u obou podskupin byla 74 % vs 87 % – tento rozdíl byl hraničně statisticky významný ($p = 0,05$). Medián doby do relapsu/progrese celého souboru nebyl dosažen, 3. kvartil byl 20 měsíců. Pravděpodobnost 2letého přežití bez progrese byla u pacientů s přetrvávající Bcl-2/IgH pozitivitou 38 %, u Bcl-2/IgH negativních 81 % ($p = 0,004$). Pravděpodobnost dvouletého přežití bez události byla u skupiny s přetrvávající Bcl-2/IgH pozitivitou 37 %, u skupiny s Bcl-2/IgH negativitou 81 % ($p = 0,004$).



Graf 1. Graf celkového přežití u pacientů, kteří dosáhli Bcl-2/IgH negativity po terapii vs nemocní Bcl-2/IgH pozitivní.



Graf 2. Graf doby do progresu u pacientů, kteří dosáhli Bcl-2/IgH negativity po terapii vs nemocní Bcl-2/IgH pozitivní.

u Bcl-2/IgH negativních 75 % ($p = 0,01$). Medián sledování této části souboru je 34 měsíců (rozmezí 4 – 54). Křivky porovnávající OS a PFS u obou skupin po léčbě jsou uvedeny v grafech 1 a 2. Porovnáním vstupních charakteristik s výsledky léčby bylo zjištěno, že v našem souboru bylo dosažení Bcl-2/IgH negativity asociováno s těmito faktory: věk < 65 let ($p = 0,02$), performance status 0 + 1 v úvodu ($p = 0,02$) a hraničně i index FLIPI ($p = 0,05$), tab. 4. Porovnáním léčebných výsledků nemocných, kteří kdykoliv během léčby dosáhli Bcl-2/IgH negativity se skupinou, u kterých přetrvávala Bcl-2/IgH pozitivita, byl nalezen rozdíl mezi oběma skupinami v delší době do progresu, době do události a hraničně i v delším přežití ve prospěch skupiny Bcl-2/IgH negativních po léčbě. PCR negativní status po léčbě tak byl dle našeho sledování spojen s dlouhodobější remisí onemocnění, nižším rizikem relapsu a s naznačeným trendem k delšímu celkovému přežití.

Diskuse

V našem souboru 50 nemocných jsme prokázali přítomnost Bcl-2/IgH přestavby v MBR nebo mcr oblasti u 52 % nemocných, což odpovídá vý-

Tab. 4. Klinické, laboratorní a léčebné charakteristiky nemocných ve vztahu k vymizení či přetrvávání Bcl-2/IgH přestavby po celé léčbě.

	Bcl-2/IgH negativní, n = 18 (%)	Bcl-2/IgH pozitivní, n = 7 (%)	P-hodnota
Mužské pohlaví	73	57	NS
Věk ≥ 65 let	6	57	0,02
Grade FL			
I + II	89	100	NS
Stadium			
I + II	6	14	NS
B symptomy	28	43	NS
Performance status dle WHO			
0–1	100	57	0,02
LDH > norma	44	71	NS
β-2-mikroglobulin > norma	59	71	NS
Lymfatické uzliny > 5 cm	6	14	NS
Extranodální postižení (mimo dřeň)	17	0	NS
Postižení dřeň	89	86	NS
FLIPI			
3–5 (vysoké riziko)	33	43	NS
Dosažení uCR + CR	50	43	NS
Rituximab v léčbě	89	100	NS
Režimy podané léčby			
CHOP-like ± rituximab	67	71	NS
Relaps/progrese	27	71	0,04
Žijící nemocní	94	43	0,02
Délka sledování (medián, měsíce)	33	38	NS

sledkům prezentovaným ostatními autory z evropských pracovišť. Italští autoři našli Bcl-2/IgH pozitivitu u 69 %

[17], francouzští pak v 64 % [4]. Relativně nižší výskyt může být způsoben skutečností, že v našem souboru

byla testována jen 2 nejčastější zlo-
mová místa – MBR a mcr. Tento rozdíl
ale není signifikantní. Samotná che-
moterapie vede k dosažení Bcl-2/IgH
negativity jen u malé části nemocných
– v našem souboru dosáhlo negativity
14 % nemocných. V práci italských
autorů tomu bylo po chemoterapii
CHOP u 30 % nemocných [19]. Nižší
procento molekulárních remisí po
samotné chemoterapii bylo spojeno
v našem souboru i se statisticky signi-
fikantně nižší pravděpodobností do-
sažení klinické kompletní remise oproti
skupině léčené kombinací rituximabu
a chemoterapie (28 % vs 71 %, $p =$
 $= 0,007$). Přidání rituximabu k chemo-
terapii vedlo u našich nemocných ke
statisticky vyššímu dosažení moleku-
lárních remisí než po podání samotné
CHT (14 %), a to u 64 % nemocných
– tento rozdíl byl statisticky významný
($p = 0,037$). Význam rituximabu pro
dosažení molekulárně genetické re-
mise onemocnění byl prezentován
mnoha autory, a to jak při podání
v monoterapii [4], tak v kombinaci
s chemoterapií CHOP [5]. Z 18 ne-
mocných ve studii Czuczmana et al
bylo informativních pro Bcl-2/IgH
přestavbu 7 pacientů – u všech došlo
po podání 6 cyklů R-CHOP k dosažení
molekulárně genetické remise. U naší
skupiny nemocných léčených samotu-
nou CHT, kterým byly podány 4 dávky
rituximabu po 1 týdnu, dosáhlo 9/12
(75 %) molekulární remise. Nástup
Bcl-2/IgH negativity byl pozvolný,
7/12 nemocných dosáhlo vymizení
Bcl-2/IgH přestavby při kontrole za
1 měsíc po skončení léčby rituxima-
bem, 2 ze zbývajících 5 pak v intervalu
3, resp. 6 měsíců po léčbě. Doznívající
efekt rituximabu je způsoben přetrvá-
váním jeho hladiny několik měsíců po
poslední dávce. Rambaldi et al pre-
zentovali výsledky sledování MRN po
chemoterapii CHOP s následným sek-
venčním podáním rituximabu u sku-
piny 128 nemocných s FL. Po chemo-
terapii CHOP bylo zařazeno do sle-
dování MRN 77 nemocných, kterým
byly podány sekvenčně 4 dávky rituxi-

mabu po 1 týdnu. Molekulárně gene-
tická odpověď byla sledována 12,
28 a 44 týdnů po podání rituximabu.
PCR negativity dosáhlo v daných ča-
sových obdobích 59 %, 74 %, resp. 63 %
nemocných. Dosažení Bcl-2/IgH ne-
gativity v této práci korelovalo s lepší
prognózou onemocnění [19]. Skuteč-
nost, že podání rituximabu kdykoliv
během terapie v našem souboru ne-
bylo statisticky signifikantně spojeno
s lepší molekulárně biologickou od-
povědí, je způsobena tím, že počet
nemocných, kteří rituximab nedostali,
byl velmi nízký.

Hlavním cílem naší práce bylo zhod-
notit klinický význam dosažení Bcl-2/
IgH negativity na osud nemocných.
Dosažení molekulární remise v které-
koliv fázi léčby bylo v našem sledování
spojeno se statisticky významně del-
ším obdobím do progresu ($p = 0,004$)
i období do události ($p = 0,01$) oproti
skupině Bcl-2/IgH pozitivních. Vliv na
prodloužení celkového přežití byl shle-
dán jako hraniční ($p = 0,05$) ve pro-
spěch Bcl-2/IgH negativních pacientů.
Pozitivní význam dosažení molekulárně
genetické remise na prognózu one-
mocnění byl prezentován mnoha au-
tory, a to jak po podání intenzivní
chemoterapie – „alternative tripple
therapy“ a FND [13], tak po podání
samotného rituximabu [4] či vysoko-
dávkované léčby s podporou kmeno-
vých buněk [12]. Existují ale i práce,
které tuto hypotézu nepodporují. Ve
Foranově práci je prezentováno 62 %
nemocných, kteří dosáhli po 4 dávkách
rituximabu molekulárně genetické re-
mise onemocnění – tato skutečnost
ale nekorelovala s klinickou odezvou
[6]. Podobně rozporuplné výsledky pre-
zentoval Mandigers, který vyšetřoval
Bcl-2/IgH přestavbu u nemocných
po chemoterapii COP s interfero-
nem α . Dosažení molekulárně gene-
tické remise v této studii nekorelovalo
s klinickou prognózou nemocných [15].
Závěrem lze shrnout, že naše studie
prokázala statisticky významně vyšší
procento CR i molekulárních remisí
po podání imunochemoterapie s ri-

tuximabem oproti samotné chemo-
terapii a současně i unikátní schop-
nost rituximabu dosáhnout eliminace
Bcl-2/IgH pozitivních buněk v periferní
krvi a/nebo v kostní dřeni, které pře-
trvávaly po podání chemoterapie sa-
motné (v 75 %). Z tohoto pohledu je
oproti jiným postupům, které jsou
schopny vést k dosažení molekulární
remise (např. autologní transplantace)
hlavní výhodou rituximabu nízká toxi-
cita, čímž odpadá riziko sekundárních
nádorů. Přestože nemocní po dosa-
žení Bcl-2/IgH negativity již nebyli dále
dlouhodobě molekulárně geneticky
sledováni, lze konstatovat, že dosažení
molekulární remise do 6 měsíců po
léčbě bylo v naší práci spojeno s lepší
prognózou nemocných stran PFS
a EFS. Význam dosažení Bcl-2/IgH ne-
gativity stran delšího přežití byl hra-
niční, z tohoto pohledu bude nutné
delší sledování souboru. Hlavní pro-
blém pro zavedení monitorování
Bcl-2/IgH pozitivních buněk v periferní
krvi/kostní dřeni v běžné klinické praxi
vyplývá z toho, že i přes dosažení
Bcl-2/IgH negativity nemusí dojít k eli-
minaci vlastního nádoru v uzlinách.
Oba kompartmenty (periferní krev
i kostní dřeň) jsou totiž až sekundárně
postiženými oblastmi – primárně se
jedná o uzlinové onemocnění. I přes
dosažení Bcl-2/IgH negativity v peri-
ferní krvi/kostní dřeni proto nelze vy-
loučit přítomnost reziduálních nádor-
ových buněk v původně postižených
uzlinách. Dalším problémem je roz-
dílná záchytnost Bcl-2/IgH pozitivních
buněk v periferní krvi oproti kostní
dřeni. V našem souboru bylo u 23 ze
26 Bcl-2/IgH pozitivních nemocných
zjištěno postižení obou kompart-
mentů současně. Korelace mezi obě-
ma kompartmenty tedy byla v našem
souboru velmi dobrá. Podobné vý-
sledky prezentoval Summers [21], na-
opak některé práce poukazují na
kostní dřeň jako spolehlivější kom-
partment pro průkaz Bcl-2/IgH ele-
mentů než periferní krev [12]. Po léč-
bě u skupiny s přetrvávající Bcl-2/IgH
pozitivitou byla shledána shoda mezi

periferní krvi a kostní dřeni u 11 z 18 nemocných (61 %). U 5 z 18 nemocných bylo dosaženo Bcl-2/IgH negativity v periferní krvi při přetrvávající pozitivě v kostní dřeni a naopak u 2 z 18 nemocných dosáhli vymizení Bcl-2/IgH v kostní dřeni s detekovatelnými Bcl-2/IgH pozitivními elementy v periferní krvi. Účinnost léčby (zejména rituximabu) při eliminaci Bcl-2/IgH pozitivních buněk se jeví vyšší v periferní krvi než v kostní dřeni. K obdobným závěrům dospěli například i italští autoři [18]. Závěrem lze konstatovat, že pro zavedení monitorování Bcl-2/IgH do běžné klinické praxe je nezbytné sjednocení metodik stanovení této představby mezi laboratořemi a současně i stanovení optimálního kompartmentu, ve kterém by mělo být sledování prováděno – zda jím bude periferní krev, kostní dřev nebo lymfatická uzlina, není dosud zcela jasné.

Poděkování

Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 a grantem IGA NR/9453-3 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

Literatura

1. Apostolidis J, Gupta RK, Granzelias D et al. High-Dose Therapy With Autologous Bone Marrow Support as Consolidation of Remission in Follicular Lymphoma: Long-Term Clinical and Molecular Follow-Up. *J Clin Oncol* 2000; 18: 527–536.
2. Armitage J, Wiesenburger D New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas. Clinical features of the major histologic subtypes. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2780–2795.
3. Bakhshi A, Wright JJ, Graniger W et al. Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of the both derivate 14 and 18 reciprocal partners. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2396–2400.
4. Colombat P, Salles G, Brousse N et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood* 2001; 97: 101–106.
5. Czuczman MS, Grillo-López AJ, McLaughlin P, White CA et al. Clearing of cells bearing the Bcl-2 [t(14;18)] translocation from blood and marrow of patients treated with rituximab alone or in combination with CHOP chemotherapy. *Ann Oncol* 2001; 12: 109–114.
6. Foran JM, Gupta RK, Cunningham D et al. A UK multicentre phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) in patients with follicular lymphoma, with PCR monitoring of molecular response. *Br J Haematol* 2000; 109: 81–88.
7. Glass AG, Karnell LH, Menck HR. The national Cancer Data Base report on non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1997; 80: 2311–2320.
8. Gribben JG, Freedman AS et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1525–1531.
9. Gribben JG, Neuberg D, Barber M et al. Detection of Residual Lymphoma Cells by Polymerase Chain Reaction in Peripheral Blood Is Significantly Less Predictive for Relapse Than Detection in Bone Marrow. *Blood* 1994; 83: 3800–3807.
10. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for nonHodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1244. Erratum in: *J Clin Oncol* 2000; 18: 2351.
11. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457–481.
12. Ladetto M, Corradini P, Vallet S et al. High rate of clinical and molecular remissions in follicular lymphoma patients receiving high-dose sequential chemotherapy and autografting at diagnosis: a multicenter, prospective study by the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITO). *Blood* 2002; 100: 1559–1564.
13. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P et al. Molecular response assessed by PCR is the most important factor predicting failure-free survival in indolent follicular lymphoma: Update of the MDACC series. *Ann Oncol* 2000; 11(Suppl 1): S137–S140.
14. Mahé B, Milpied N, Mellerin MP et al. PCR detection of residual Bcl-2/IgH-positive cells after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation is a prognostic factor for event-free survival in patients with low-grade follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transpl* 2003; 31: 467–473.
15. Mandigers CM, Meijerink PP, Menseink EM et al. Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood* 2001; 98: 940–944.
16. Papajik T, Jedličková K, Krigerová E et al. Polymerase chain reaction detection of cells carrying t(14;18) in bone marrow of patients with follicular and diffuse large B-cell lymphoma: the importance of analysis at diagnosis and significance of long term follow-up. *Neoplasma* 2001; 6: 501–505.
17. Pezzella F, Jones M, Ersboll J et al. Evaluation of Bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *British J Can* 1992; 65: 87–89.
18. Rambaldi A, Lazzari M, Manzoni C et al. Monitoring of minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. *Blood* 2002; 99: 856–862.
19. Reff ME, Carner K et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83: 435–445.
20. Rogers J, Jackson J, Rosenberg J et al. Clearance of Bcl-2 t(14;18) from peripheral blood and bone marrow in patients with relapsed low-grade or follicular lymphoma following single-agent therapy with the chimeric anti-CD20 antibody IDEC-C2B8. *Ann Oncol* 1996; 7: 108a (abstract).
21. Summers KE, Davies AJ, Matthews J et al. The relative role of peripheral blood and bone marrow for monitoring molecular evidence of disease in follicular lymphoma by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 2002; 118: 563–566.
22. Tsijumoto Y, Finger L, Yunis J et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097–1099.

MUDr. David Belada

www.fnhk.cz

e-mail: david.belada@seznam.cz

Doručeno do redakce: 12. 3. 2007

Přijato po recenzi: 4. 5. 2007