

# Transfuze a hematologie *časopis*

ČASOPIS SPOLEČNOSTI PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ  
A ČESKÉ HEMATOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

## II. ČESKÝ HEMATOLOGICKÝ A TRANSFUZILOGICKÝ SJEZD

12. - 15. září 2021

NH Collection Olomouc Congress



Časopis je indexován v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik Rady vlády pro výzkum a vývoj ČR, v EMBASe/Excerpta Medica a v EBSCO-Academic Search Complete. Indexováno a excerpováno v databázi SCOPUS. Excerpováno v BIBLIOGRAPHIA MEDICA ČECHOSLOVACA.

Vydání časopisu bylo podpořeno Ministerstvem zdravotnictví České republiky.

## II. český hematologický a transfuziologický sjezd

12.–15. září 2021

## Edukační program



Česká hematologická  
společnost ČLS JEP

# II. ČESKÝ HEMATOLOGICKÝ A TRANSFUZIOLOGICKÝ SJEZD



12. – 15. září 2021

NH Collection Olomouc Congress

POŘADATELÉ:



Česká hematologická  
společnost ČLS JEP



ČSTH  
ČESKÁ SPOLEČNOST PRO TROMBÓZU A HEMOSTÁZU  
České lékařské společnosti J. E. Purkyně

# Transfuze a hematologie *dnes*

ročník 27 | 2021 | **Supplementum 1**

## POŘADATELÉ SJEZDU

Česká hematologická společnost ČLS JEP  
Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP  
Česká společnost pro trombózu a hemostázu ČLS JEP

## PREZIDENT SJEZDU

prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc.

## ČESTNÝ PREZIDENT SJEZDU

prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

## VICEPREZIDENTI SJEZDU

plk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.  
prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc.

## VĚDECKÝ VÝBOR

**Předseda vědeckého výboru:** prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.

**Členové vědeckého výboru:** za Českou hematologickou společnost ČLS JEP – prof. MUDr. Angelika Bátorová, CSc., doc. MUDr. Jan Blatný, Ph.D., prof. MUDr. Petr Cetkovský, Ph.D., MBA, prof. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc., prof. MUDr. Michael Doubek, Ph.D., doc. MUDr. Luboš Drgoňa, CSc., prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., MUDr. Pavel Jindra, Ph.D., Mgr. Petra Kouřilová, prof. MUDr. Tomáš Kozák Ph.D., MUDr. Dana Mikulenková, doc. MUDr. Martin Mistrík, Ph.D., Zdeňka Pavlíková, prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., prof. MUDr. Jan Starý, DrSc., prof. MUDr. Jan Trka, Ph.D., MUDr. Alexander Wild, prof. MUDr. Marek Trněný, CSc., prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.  
za Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP – doc. MUDr. Zuzana Čermáková, Ph.D., MUDr. Daniela Dušková, Ph.D., doc. MUDr. Zdenka Gašová, CSc., MUDr. Hana Lejdarová, MUDr. Jiří Masopust, MUDr. Martin Písačka, MUDr. Renata Procházková, Ph.D., MUDr. Vít Řeháček, MUDr. Petr Turek, CSc.  
za Českou společnost pro trombózu a hemostázu ČLS JEP – doc. MUDr. Petr Dulíček, Ph.D., MUDr. Jaromír Gumulec, prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc., MUDr. Peter Salaj

## ORGANIZAČNÍ VÝBOR

**Předseda organizačního výboru:** prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

**Členové organizačního výboru:** za Českou hematologickou společnost ČLS JEP – doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D., MUDr. Antonín Hluší, Ph.D., Mgr. Jarmila Juráňová, Bc. Jana Kadlecová, doc. Ing. Eva Kriegová, Dr., Bc. Monika Labudíková, doc. MUDr. Mgr. Jiří Minařík, Ph.D., prof. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D., prof. MUDr. Vít Procházka, Ph.D., MUDr. Luděk Raida, Ph.D., doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D., doc. MUDr. Tomáš Sztokowski, Ph.D., Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.  
za Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP – MUDr. Alice Entrová, MBA, Michaela Fedorco, DiS., MUDr. Dana Galuszková, Ph.D., MBA, MUDr. Iva Holousková, Ph.D., Bc. Marta Vodičková  
za Českou společnost pro trombózu a hemostázu ČLS JEP – RNDr. Ingrid Hrachovinová, Ph.D., Bc. Markéta Klainerová, Ing. Jana Štikarová, Ph.D.

## ZÁŠTITU NAD II. ČESKÝM HEMATOLOGICKÝM A TRANSFUZILOGICKÝM SJEZDEM PŘEVZALI:

Prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., *předseda České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*  
Prof. MUDr. Martin Bareš, Ph.D., *rektor Masarykovy Univerzity v Brně*  
Prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D., *rektor Univerzity Palackého v Olomouci*  
Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA, *rektor Karlovy Univerzity v Praze*

# PŘEHLED ŘEČNÍKŮ V EDUKAČNÍM PROGRAMU SJEZDU

## TROMBÓZA

Radovan Malý (Hradec Králové)  
Tomáš Kvasnička (Praha)  
Zdena Kovářová Kudrnová (Praha)  
Petr Dulíček (Hradec Králové)

## KRVÁCENÍ

Angelika Bátorová (Bratislava)  
Vladimír Komrská, Ester Zápotocká (Praha)  
Petr Smejkal (Brno)  
Petr Dulíček (Hradec Králové)  
Jaromír Gumulec (Ostrava)

## MNOHOČETNÝ MYELOM

Vladimír Maisnar (Hradec Králové)  
Jiří Minařík (Olomouc)  
Roman Hájek (Ostrava)  
Tomáš Jelínek (Ostrava)

## NOVINKY V DIAGNOSTICE A TERAPII LYMFOMŮ

Vít Procházka (Olomouc)  
Andrea Janíková (Brno)  
Andrej Vranovský (Bratislava)

## IMUNOTERAPIE LYMFOMŮ

Daniel Lysák (Plzeň)  
František Folber (Brno)  
Kamila Polgárová (Praha)  
Jan Kořen (Praha)

## LABORATORNÍ HEMATOLOGIE – CYTOMORFOLOGIE

Dana Mikulenková, Vít Campr (Praha)  
Alena Bulíková (Brno)  
Ondřej Souček (Hradec Králové),  
Renata Šimečková (Praha)  
Jana Zuchnická (Ostrava)

## LABORATORNÍ HEMATOLOGIE – KOAGULACE

Michaela Mikešová (Praha), Martin Pulcer  
(Ostrava)  
Ivana Malíková (Praha)  
Ingrid Hrachovinová (Praha)  
Pavla Šigutová (Plzeň)  
Jiřina Zavřelová (Brno)  
Miloslava Matýšková (Brno)

## CML/MPN

Satu Mustjoki (Helsinki, Finsko)  
Kateřina Machová Poláková (Praha)  
Jan Zuna (Praha)  
Jiří Schwarz (Praha)

## AKUTNÍ LEUKÉMIE

Nicolas Boissel (Paříž, Francie)  
Cyril Šálek (Praha), Michael Doubek (Brno)  
Jan Starý, Markéta Kubričanová Žaliová  
(Praha)  
Pavel Žák (Hradec Králové)

## TRANSLAČNÍ HEMATOLOGIE

Tomáš Kalina, Veronika Kanderová (Praha)  
Ingrid Hrachovinová (Praha)  
Šárka Pospíšilová (Brno)  
Monika Belíčková (Praha)

## ZÁKLADNÍ VÝZKUM V HEMATOLOGII

Ctirad Škoda (Basilej, Švýcarsko)  
Dagmar Pospíšilová (Olomouc)  
Nikola Čuřík (Praha)  
Karloína Škvárová Kramaržová  
(Praha)

## CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE

Peter Hillmen (Leeds, UK)  
Marek Mráz (Brno)  
Tomáš Papajík (Olomouc)  
Michael Doubek (Brno)

## MDS

Jaroslav Čermák (Praha)  
Libor Červínek (Brno)  
Anna Jonášová (Praha)  
Martina Suková (Praha)

## ANÉMIE

Eva Froňková (Praha)  
Dagmar Pospíšilová (Olomouc)  
Jaroslav Čermák (Praha)

## PODPŮRNÁ A PALIATIVNÍ TERAPIE

Michal Kouba (Praha)  
Pavel Žák (Hradec Králové)  
Luboš Drgoňa (Bratislava)  
Tomáš Szotkowski (Olomouc)

## TRANSPLANTACE A BUNĚČNÁ TERAPIE

Daniel Lysák (Plzeň)  
Robert Pytlík R. (Praha)  
Pavel Jindra (Plzeň)  
Petr Cetkovský (Praha)  
František Folber (Brno)

## VZÁCNÁ ONEMOCNĚNÍ

Tomáš Kozák (Praha)  
Tomáš Pika (Olomouc)  
Michal Kaščík (Ostrava)  
Zdeněk Adam (Brno)

## CYTOPENIE

Jaromír Gumulec (Ostrava)  
Libor Červínek (Brno)  
Michael Doubek (Brno)  
Tomáš Kozák (Praha)

## COVID-19

Zdeněk Ráčil, Pavel Žák  
(Praha, Hradec Králové)  
Vladimír Šrámek (Brno)  
Jaromír Gumulec (Ostrava)  
Miloš Bohoněk (Praha)  
Ondřej Beran (Praha)

## TERAPEUTICKÉ HEMAFERÉZY A BUNĚČNÁ TERAPIE

Zdeňka Gašová (Praha)  
Miriam Lánská (Hradec Králové)  
Zdeňka Bhuiyanová Ludvíková  
(Praha)  
Šárka Blahutová (Ostrava)

## IMUNOHEMATOLOGIE

Tereza Bolcková (Praha)  
Eva Miarková (Praha)  
Lenka Řehořová,  
Renata Procházková (Liberec)  
Martin Písačka (Praha)

## KLINICKÁ TRANSFUZIOLOGIE – MEZIOBOROVÉ TÉMA

Mark Yazer (USA)  
Philip Spinella (USA)  
Renata Procházková (Liberec)  
Pavel Sedlák (Liberec)

## ZDRAVOTNÍ LABORANTI – HEMATOLOGIE

Renata Horáková (Praha)  
Dagmar Zmeškalová (Praha)  
Martina Brillantová (Ostrava)  
Petra Burgerová (Brno)  
Martina Sečkařová (Olomouc)  
Kristýna Kmentová (Praha)  
Markéta Šibová (Hradec Králové)

# Obsah

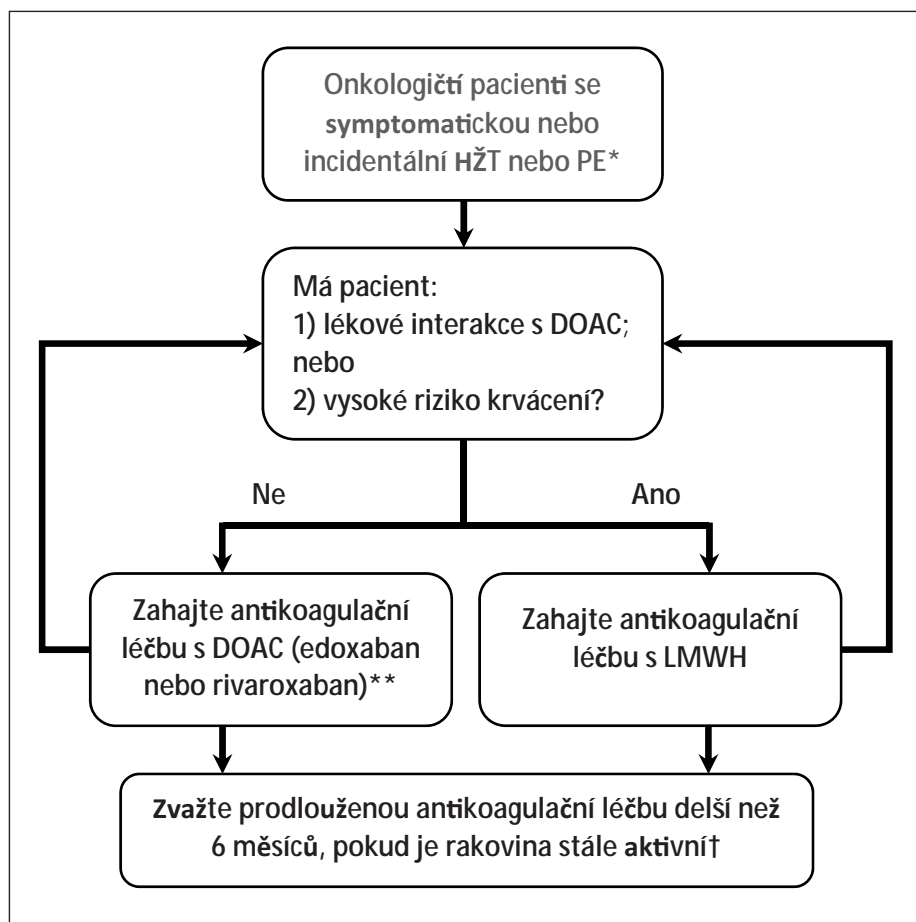
<b>1. část – Program České společnosti pro trombózu a hemostázu ČLS JEP</b>	<b>S6</b>
1. Trombóza a hemostáza	S6
2. Krvácení	S10
<b>2. část – Program České hematologické společnosti ČLS JEP</b>	<b>S24</b>
1. Mnohočetný myelom	S24
2. Novinky v diagnostice a terapii lymfomů	S34
3. Laboratorní hematologie – cytomorfologie	S41
4. Laboratorní hematologie – koagulace	S47
5. Chronická myeloidní leukémie / myeloproliferativní choroby	S56
6. Akutní leukémie	S61
7. Translační hematologie	S68
8. Základní výzkum v hematologii	S75
9. Imunoterapie lymfomů	S84
10. Chronická lymfocytární leukémie	S98
11. Myelodysplastický syndrom	S106
12. Anémie	S123
13. Podpurná a paliativní terapie	S133
14. Transplantace krvetvorných buněk	S139
15. Vzácná onemocnění	S152
16. Cytopenie	S161
17. COVID-19	S172
<b>3. část – Program Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP</b>	<b>S191</b>
1. Terapeutické hemaferézy	S191
2. Imunohematologie	S200
3. Klinická transfuziologie	S203
<b>4. část – Program sekce zdravotních laborantů – hematologie</b>	<b>S207</b>

# Prevence a léčba tromboembolických komplikací v onkologii

Kvasnička T.

Trombotické centrum ÚLBDL 1. LF UK a VFN

Aktivní forma nádorového onemocnění patří mezi nejvýznamnější z perzistujících rizikových faktorů (RF) provokované formy žilní tromboembolické nemoci (VTE). Aktivní malignita je definována jako onkologické onemocnění diagnostikované v posledních 6 měsících, recidivující, lokálně pokročilé či metastazující onkologické onemocnění, jehož léčba probíhala v posledních 6 měsících, nebo hematoonkologické onemocnění bez kompletní remise. Riziko VTE u pacientů s karcinomem je 6x vyšší oproti pacientům bez karcinomu. Riziko významně zvyšují i další faktory: chirurgický zákrok (velký rozsah, poškození tkání a cév), pooperační období (často dlouhodobá imobilizace), podávaná protinádorová léčba zahájená v pooperačním období, umístění centrálního žilního katetru a eventuálně primární trombofilní stav. VTE je častou a významnou komplikací u pacientů s karcinomem a druhým nejčastějším důvodem jejich úmrtí. VTE má jako komplikaci 4–20 % pacientů s karcinomem, 20 % pacientů s VTE má aktivní formu karcinomu a 4–12 % pacientů s idiopatickou formou VTE má nerozpoznaný karcinom (paraneoplastická forma). Incidentální (náhodná) plicní embolizace (*incidental pulmonary embolism* – IPE) je častým nálezem rutinní počítačové tomografie (CT) hrudníku (1,1 % z prováděných koronárních CT, 3,6 % z onkologických CT). Diagnostika IPE je přesná až po segmentální a subsegmentální tepny. Zvýšené používání pokročilejší technologie CT se časově shodovalo se zvýšením míry zachytu náhodných subsegmentálních PE. Výběr medikace a délka antikoagulační léčby je stejná jako u symptomatické PE. Pacienti s aktivním nádorovým onemocněním mají zvýšené riziko závažného krvácení (cca 2–6x) oproti pacientům bez



**Schéma 1. Navrhovaný algoritmus léčby symptomatické a incidentální HŽT nebo PE u onkologických pacientů (zdroj: Blood 2019; 133(4): 291–298).**

\* U pacientů s izolovanou jednotlivou subsegmentální PE bez současné HŽT zvažte možnost vysazení antikoagulační léčby; u pacientů s vysokým rizikem krvácení.

\*\* Edoxaban je podáván po zahájení léčby LMWH po dobu nejméně 5 dnů.

† Rozhodnutí pokračovat v antikoagulační léčbě delší než 6 měsíců by mělo také vyvážit riziko rekurentního ŽTE a krvácivých komplikací v kombinaci s preferencemi pacientů, délkou života a náklady na léčbu.

Pozn.: Posuďte lékové interakce a riziko krvácení během sledování a podle toho změňte antikoagulační léčebný režim. LMWH je v současné době upřednostňovanou možností léčby.

nádorového onemocnění. Toto riziko se musí zohlednit při výběru antikoagulační léčby. V léčbě VTE asociované s malignitou (cancer associated thrombosis) LMWH stále platí jako preferenční terapie (možnost monitorace anti Xa hladin).

Výsledky prováděných studií s DOAC (SELECT-D [rivaroxaban vs. dalteparin], Hokusai VTE cancer [edoxaban vs. dalteparin], ADAM VTE [apixaban vs. dalteparin] a CARAVAGGIO [apixaban vs. dalteparin]) však naznačují, že DOAC mohou být

bezpečnou a účinnou antikoagulační alternativou u nádorů mimo gastrointestinální a urogenitální trakt a u nemocných s nízkým rizikem krvácení, pokud nehrozí interakce s probíhající onkologickou léčbou. Terapie s vitamín K anta-

gonisty (warfarin) se u pacientů s aktivní formou nádorového onemocnění nedoporučuje pro vysoké riziko krvácivých komplikací. Volba léčby má být vždy individualizovaná (shared decision making). Při terapii je nutné zohledňovat i prefe-

rence pacienta (edukace, compliance) a je nezbytné provádět pravidelné hodnocení poměru riziko/prospěch antikoagulační léčby.

*Podpořeno IPO MZČR RVO-VFN64165.*

## Trombofilní a tromboembolické stavy v graviditě

**Kovářová Kudrnová Z.**

*Trombotické centrum ŮLBLD 1. LF UK a VFN*

Tromboembolické příhody patří mezi nejobávanější komplikace v těhotenství a jsou stále na předních místech mateřské morbidity a mortality v civilizovaných zemích. V graviditě se také často poprvé manifestují dědičné i získané trombofilie.

Trombofilie je vrozená či získaná porucha hemostatického mechanismu, charakterizovaná zvýšenou tendencí ke krevnímu srážení a trombotizaci. Předchází vlastnímu procesu trombogeneze, který je pak vyvolán některým ze spouštěcích podnětů (uvolněním tkáňového faktoru po poranění, zvýšenou viskozitou krve při dehydrataci, zvýšenou hladinou estrogenů vedoucí k dilataci cév spojené se stázou krve a k těhotenské hyperkoagulaci, infekcí, letem > 4 h, nádorovým bujením aj.) [1].

V těhotenství trombofilie nezvyšuje pouze riziko vzniku žilní tromboembolické příhody, ale také riziko vzniku dalších chorobných stavů spojených s nitrocévní trombogenezí. Setkáváme se ve větší míře i s časnými opakovanými potraty, odumřením plodu in utero, růstovou retardací plodu a pozdními těhotenskými komplikacemi (např. preeklampsie, abrupce placenty, HELLP syndromem) [1–3].

Regulace hemostázy v graviditě je velmi složitý rovnovážný systém. Fyziologické těhotenství je asociováno s patrnými laboratorními změnami ve všech součástech hemostázy, zahrnujícími vze-

stup koncentrace většiny koagulačních faktorů, pokles koncentrace některých inhibitorů koagulace a ztlumení fibrinolytické aktivity, což vede k hyperkoagulačnímu stavu. I když tyto změny, které jsou způsobeny hormonálními vlivy, chrání těhotnou ženu před závažným krvácením při porodu, jsou zároveň jednou z příčin zvýšené incidence tromboembolické nemoci (TEN) v graviditě a šestinedělí [4].

Podle vyvolávající příčiny dělíme klinicky významné těhotenské trombofilie na dědičné a získané [1].

### ZÍSKANÉ TROMBOFILIE

Zvýšení koagulačních faktorů: FVIII, fibrinogenu, inhibitoru PAI-1 a snížení inhibitoru koagulace PS, které je fyziologické při postupně narůstající hladině estrogenů v II. a zejména III. trimestru, nebo vyvolané po podání gonadotropinů při asistované reprodukci.

Antifosfolipidový syndrom je spojen se zvýšeným rizikem hluboké žilní trombozy a těhotenských komplikací. Pro diagnózu antifosfolipidového syndromu je potřeba současná přítomnost klinických a laboratorních známek tohoto onemocnění. Mezi sérologická kritéria potvrzující diagnózu antifosfolipidového syndromu patří přetrvávající nález pozitivních protilátek lupus antikoagulans (LA) a/nebo IgG nebo IgM pozitivita antikardiolipinových protilátek (aCL) a/nebo vysoký titr IgG nebo IgM protilátek proti beta-2-glykopro-

teinu (anti-beta2 GP) 1. Pro diagnózu je důležitý opakovaný průkaz těchto protilátek v minimálním časovém odstupu 12 týdnů, neboť jejich dočasné zvýšení může být pozorováno i u některých infekčních stavů a v souvislosti s podáním některých léků. Mezi klinické známky antifosfolipidového syndromu jsou řazeny opakující se trombozy a/nebo opakující se ztráty těhotenství, a to ztráta plodu po 12. týdnu nebo 3 potraty v anamnéze [5].

### DĚDIČNÉ TROMBOFILIE

Zvýšení koncentrace koagulačních faktorů: Zvýšení hladiny FII protrombinu (> 130 %) při mutaci genu FII 20210G > A. Frekvence této dědičné trombofilie v ČR je 2,5 % heterozygotů bez rozdílů pohlaví [1].

Porucha regulace hemokoagulace: Při mutaci genu FV Leiden (1691G > A), která vede k rezistenci aktivovaného koagulačního faktoru V vůči účinku aktivovaného inhibitoru koagulace PC (homozygoti OR 34,4; heterozygoti OR 8,32). Frekvence heterozygotů s touto dědičnou mutací je v ČR 8,8 % a homozygotů 0,7 %, opět bez rozdílů pohlaví [1].

Při nedostatku inhibitorů koagulace: deficit antitrombinu (< 80 % aktivity, OR 4,76) nebo deficit proteinu C (< 70 % aktivity, OR 4,69) a deficit proteinu S (< 55 % hladiny, OR 3,19). Prevalence výskytu těchto trombofilních stavů je však v populaci nízká, celkem se vyskytují jen asi v 1 % [1].

**Tab. 1. Změny hemostázy v těhotenství.**

Změny hemostázy v těhotenství	Stoupá	Klesá	Nemění se
koagulační faktory	I, V, VII, VIII, IX, X	XI	II
inhibitory koagulace	trombomodulin	PS	PC
adhezivní molekuly	vWF		
fibrinolýza	PAI-1, PAI-2	t-PA	TAFI
mikropartikelky a AP protilátky	MP		APLA
lokální změny v placentárním oběhu	TF	TFPI	

## INDIKACE VYŠETŘENÍ TROMBOFILNÍCH STAVŮ V GRAVIDITĚ

Laboratorní vyšetření k zjištění trombofilie je doporučeno indikovat pouze selektivně, a to u žen po opakovaných 3 potratech v I. trimestru gravidity nebo u každé ztráty plodu po tomto období gravidity; u těhotných žen s pozitivní osobní nebo rodinnou anamnézou prodělaného tromboembolizmu nebo s komplikacemi v graviditě (preeklampsie, růstová retardace plodu nebo po abrupci placenty) [6].

## ANTITROMBOTIKA V GRAVIDITĚ

Těhotenství je samo o sobě spojeno se zvýšeným trombofilním rizikem a při přítomnosti dalších rizikových faktorů (vrozených či získaných) spojených s tromboembolickou nemocí je třeba zhodnotit riziko žilního tromboembolizmu a podle

toho zavést adekvátní prenatalní a postnatalní preventivní opatření. Zhodnocení rizika TEN by mělo být provedeno u každé těhotné ženy v časně graviditě, optimálně v rámci komplexního prenatalního vyšetření do 14. týdne gravidity. U žen s vysokým rizikem tromboembolizmu má být další postup konzultován se specialistou (hematolog, trombotické centrum). Je doporučován individuální přístup ke každé těhotné [7].

Lékem volby jsou nízkomolekulární hepariny (LMWH), které jsou bezpečné v graviditě i při laktaci. Laboratorně lze účinnost podávané dávky LMWH posoudit podle výše dosažené inhibice faktoru Xa v plazmě těhotné ženy s odběrem krve po uplynutí 4hodinového intervalu od jeho subkutánní aplikace. Profylaktické a terapeutické dávky jednotlivých LMWH jsou uvedeny v jejich SPC [7]. Přímá perorální antikoagulancia – inhibitory faktoru

Xa (rivarixaban apixaban) i přímý inhibitor trombinu (dabigatran etexilate) – jsou u gravidních a kojících žen kontraindikovány. Warfarin, který prochází placentou, je v graviditě kontraindikován (výjimkou je profylaxe u těhotných žen s mechanickou chlopenní náhradou). Nevylučuje se však do mateřského mléka a kojení může pokračovat i při léčbě warfarinem [8].

## Literatura

1. Kvasnička J, Živný J. Trombotické stavy v těhotenství a v šestinedělí. Moderní gynekologie a porodnictví 1999;8(2):144–151.
2. Alfirevic Z, Martlew V, Briscoe L et al. Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications. *Obstet Gynecol.* 2001;97:753–759.
3. Kupferminc MJ, Fait G, Many A et al. Severe preeclampsia and high frequency of thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol.* 2000;96:45–49.
4. Franchini, M. Haemostasis and pregnancy. *Thromb Haemost.* 2006;95(3):401–413.
5. Mannová J, Penka M, Štourač P. Trombofilní stavy v těhotenství. *Anest Intenziv Med.* 2016;27(6):380–389.
6. Kvasnička J. Dědičné trombofilie – doporučení k provádění genetických testů v klinické praxi: *Čas Lék Čes.* 2010;149(10):424–427.
7. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Reducing the risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. RCOG Green-top Guideline No. 37a. April 2015.
8. Státní úřad pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku Warfarin Orion. 2016. Dostupné z <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC99992.pdf&type=spc&as=warfarin-orion-spc>.

Podpořeno IPO MZČR RVO VFN64165

# Trombóza v splachnické oblasti, diagnostika, terapie

Duliček P., Ivanová E., Thibaud Z., Sadílek P., Beránek M.

FN Hradec Králové

## ÚVOD

Trombóza v splachnické oblasti (SVT) patří mezi trombózy v tzv. neobvyklé lokalizaci. Zařazujeme sem: Budd-Chiari syndrom (BCS), trombózu v. portae, trombózu mezenterických žil a trombózu splenické žíly. Často postihuje více oblastí, průběh je variabilní od forem

asymptomatických, incidentálně nalezených až po fulminantní.

Příčiny jsou lokální (nádor, cirhóza, zánět, trauma, operace) nebo celkové (MPN, PNH, trombofilie aj.). Diagnostika většinou nečiní potíže, jsou detekovány UZ, angiogCT, MRI.

## LÉČBA

1. Léčení induktoru: zánětu, tumoru, MPN, vysazení COC aj.
2. Terapie trombózy (AKT). Ta není jednodušší, trombóza je variabilní etiologie, proto je léčena různými odbornostmi. Nejsou jednoznačná doporučení, léčba je někdy spojena



**Tab. 1. Výsledky hodnocení etiologie SVT.**

SVT	80	Muži (n = 30)	Ženy (n = 50)
medián věku	38 (16–76)	41 (19–52)	36 (16–76)
F V Leiden	6	3	3
F II20210a	4	2	2
deficit proteinu C	4	1	3
deficit proteinu S	4	1	3
APS	3	2	1
JAK-2 kináza	24	9	15

s vyšším rizikem krvácení (jícnové varixy, trombocytopenie, hepatopatie). Je i otázkou, zdali léčit asymptomatické formy. U život ohrožujících stavů

je možno použít trombolýzu, u BCS zavedení TIPSu, jinak je většina případů léčena pomocí LMWH s převodem na Warfarin.

## SOUBOR

V našem sdělení hodnotíme etiologii SVT soubor 80 jedinců. Výsledky shrnuje tab. 1.

## SHRnutí

V našem souboru 80 jedinců se SVT a s mediánem věku do 40 let jsme vrozený trombofilní stav prokázali u 20 jedinců (25 %) a získaný trombofilní stav u 27 jedinců (38,6 %). V nálezech dominuje průkaz JAK-2 kináza.

## ZÁVĚR

Příčiny SVT jsou variabilní, znalost etiologie je pro další léčbu klíčová. Paušálně neléčíme incidentální nálezy, pokud to není nezbytně nutné.

# Génová terapia hemofílie

Bátorová A.

Národné hemofilické centrum, Klinika hematológie a transfuziológie LF UK a SZU, Univerzitná nemocnica, Bratislava, Slovensko

## ÚVOD

Posledné desaťročie prinieslo enormné pokroky v liečbe hemofílie, ktoré viedli k zvýšenej ochrane pred krvácaním a zlepšeniu kvality života jedincov s hemofíliou. Popri dnes už štandardne používanej profylaxii u detí i dospelých k nim prispela nová generácia faktorov s predĺženým biologickým polčasom (EHL FVIII a FIX) s personalizovaným, farmakokineticky riadeným prístupom a nedávne zavedenie profylaxie prvým nefaktorovým prípravkom, emicizumabom. Ide o bišpecifickú protilátku, ktorá imituje hemostatickú funkciu FVIII a umožňuje efektívnu profylaxiu pacientov s hemofíliou A aj v prítomnosti inhibítorov FVIII. Prínosom EHL produktov je významná redukcia počtu injekcií a udržiavanie vyššej minimálnej hladiny faktora oproti štandardným koncentrátom. Pri hemofílii B touto liečbou dokážeme zmeniť ťažký stupeň choroby na ľahký. Pre obmedzené predĺženie polčasu FVIII však takáto zmena pri hemofílii A nie je možná bez významného nárastu spotreby liekov, čo limituje dostupnosť takejto liečby. Naopak, pri hemofílii A sa už úspešne využíva nefaktorová profylaxia bišpecifickou protilátkou, zatiaľ čo pre hemofíliu B nie sú zatiaľ nefaktorové prípravky dostupné. Súčasná liečba hemofílie je teda stále suboptimálna, lebo je závislá na substitúcii exogénnych hemostatických prípravkov a úplne neeliminuje výskyt krvácania ani jeho vplyv na fyzické a mentálne zdravie a kvalitu života jedincov s hemofíliou. Dnes je ambíciou liečby hemofílie „nulový výskyt“ krvácaní a snom každého hemofilika vyliečenie hemofílie. Z tohto pohľadu sa ako najperspektívnejšia javí génová terapia (GT), ktorá ako jediná má potenciál kuratívnej liečby tohto monogénového ochorenia.

## GÉNOVÁ LIEČBA HEMOFÍLIE

Od klonovania génu F9 v roku 1982 a génu F8 v roku 1984 uplynulo takmer 30 rokov, kým sa vedomosti molekulevej genetiky transformovali do klinicky prospešného terapeutického výsledku. Rýchlosť rozvoja GT spočiatku spomaľoval malý záujem farmaceutického priemyslu o tento spôsob liečby hemofílie [1]. Okrem poznania génov F8 a F9 bolo pritom potrebné vyriešiť mnoho problémov, týkajúcich sa nielen prenášanej genetickej informácie, najvhodnejšieho cieľového tkaniva pre transfer génu ale aj výberu optimálneho vektora na prenos transgénu do organizmu príjemcu. Prvý transfer génu pri hemofílii B sa v roku 1999 uskutočnil intramuskulárnou injekciou [2], ale prvé skutočne úspešné pokusy génovej liečby sa zaznamenali po vnútrožilovej injekcii transgénu v roku 2011 [3,4] a neskôr, v roku 2014 aj u jedincov s hemofíliou A [5]. Na základe sľubných výsledkov klinických štúdií v poslednom desaťročí možno očakávať, že v najbližších 1–2 rokoch sa dočkáme registrácie prvého produktu pre GT hemofílie [1], ktorá prinesie zásadnú zmenu stratégie liečby hemofílie.

## PRINCÍP GÉNOVEJ LIEČBY HEMOFÍLIE A TRANSGÉNY FVIII A FIX

Génová liečba hemofílie spočíva v aplikácii kópie génu pre syntézu FVIII alebo FIX pomocou vektora (génový transfer) formou vnútrožilovej injekcie, pričom cieľovým orgánom je pečeň. Malá veľkosť cDNA faktora IX 1,5 kb umožňuje jej ľahkú uskladniteľnosť v celom rade vektorov, ktoré dopravujú gén do hepatocytov, ktoré sú prirodzeným miestom syntézy FIX. Pôvodne používaný „wild type“

FIX, po ktorom sa dosahovala hladina FIX 5–7 % [3] sa nahradil variantom co-hFIX-R338L, podmieňujúcim FIX Padua (Arg38Leu), ktorý má 8x vyššiu aktivitu FIX. To viedlo k dosiahnutiu terapeutických hladín FIX s použitím stredne vysokých dávok vektora [4]. Nedávno opísaný nový variant co-hFIX-CB2679d-GT, ktorý má vyššiu aktivitu ako FIX Padua vďaka lepšej afinite k FVIII i vyššej rezistencii voči antitrombínu, by mohol umožniť redukciu dávky a zníženie na dávke vektora závislej hepatotoxicity [6]. Transfer génu F8 je oveľa náročnejší pre veľkosť cDNA ( $\approx 9$  kb), ktorá presahuje kapacitu klinicky aplikovateľných vektorov 4,7 kb. Súčasná transgénna konštrukcia používa cDNA, v ktorej je B doména FVIII nahradená peptidom zloženým zo 17 aminokyselín so šiestimi glykozylačnými sekvenciami, čo umožňuje uloženie genómu do vektorovej kapsidy a zároveň posilňuje produkciu a sekreciu FVIII [7]. FVIII sa fyziologicky tvorí v endotelových bunkách sínusoidov pečene, hepatocyty teda nie sú jeho prirodzeným producentom a zatiaľ nie je známa ich skutočná kapacita pre syntézu FVIII, od ktorej sa pravdepodobne odvíja trvanie odpovede na GT hemofílie A.

## TRANSGÉNNE VEKTORY PRE HEMOFÍLIU

Vektory pre GT hemofílie sa geneticky konštruujú z prirodzene sa vyskytujúceho parvovírusu, tzv. adeno-associovaného vírusu (AAV), ktorého replikácia nie je autonómna, ale závisí na tzv. pomocnom víruse ako je adenovírus alebo vírus herpes simplex. V súčasnosti sa používajú rekombinantné AAV (rAAV), úplne zbavené kódujúcich vírusových sekvencií so zachovaním vírusových ukončení, ktoré slúžia ako signály na zabaľenie transgénu do vírusovej kapsidy.

**Tab. 1. Aktuálne prebiehajúce klinické štúdie s génovou terapiou pri hemofílii B [upravené podľa 1,13].**

Názov	Sponzor	Vektor	Dávka vektora (vg/kg)	Fáza	Počet pacientov	Hladina FIX	
		/ cDNA FIX				x ± SD	
1	SPK-9001	Spark&Pfizer	AAV5-FIX Padua	5×10 <sup>11</sup>	3	10	33,7 ± 18,5 %*
2	AMT-061	UniQure/	AAV5-FIX Padua	2×10 <sup>13</sup>	3	56	34,0 ± 19,7 %
	HOPE-B	CSL Behring					
3	FLT 180a	Freeline	AAVS3-FIX Padua	3,8×10 <sup>11</sup> –1,28×10 <sup>12</sup>	1.2	10	> 31 %*
4	AMT060	UniQure	AAV5-hFIX wild type	5×10 <sup>12</sup> 2×10 <sup>13</sup>	1.2	5 5	4,40% 6,90%
5	SB-FIX	Sangamo	AAV6-ZFN-cielená integrácia do lokusu albumínu	neudaná	1.2		
6	YUVA-GT-F9001	SGIMI	HSC/MSC-Lentivektor		1		

\*po 1. roku sledovania

HSC – hemopoietic stemm cells, MSC – mesenchymal stemm cells, vg/kg – vektorových genómov/kg

Rekombinantné AAV sú nepatogénne a neintegrujú sa do genómu hostiteľa. Po vstupe do hepatocytu sa transgén uvoľní z kapsidy a vstupuje do jadra, kde sa na báze jedno-reťazcovej DNA sformuje dvoj-reťazcová DNA, ktorá vytvorí stabilnú štruktúru v jadre a zaisťuje syntézu koagulačného proteínu. AAV vektor je deštruovaný proteázomom, peptidy kapsidy sa zhromažďujú v endoplazmatickom retikule a môžu sa dostať do kontaktu s molekulami triedy HLA 1, ktoré ich prezentujú na povrchu buniek. Transdukované hepatocyty sa tak stávajú terčom cirkulujúcich CD8+ T lymfocytov a celulárna imunita príjemcu môže spôsobiť ich zánik a teda aj zánik produkcie koagulačného faktora [1,7,8].

Dôležitým faktorom pri GT je aj sérotyp kapsidy. Dnes sa používa celý rad AAV hepatotropných sérotypov (AAV2, AAV5, AAV6, AAV8 a AAV10). Až 30–80 % jedincov bežnej populácie má však neutralizujúce anti-AAV protilátky, ktorých väzba na vektorovú kapsidu bráni transdukcii hepatocytov, čo predstavuje prekážku gébovej terapie. Najnižšiu prevalenciu majú protilátky proti sérotypu AAV5 [8]. Po systémovej aplikácii obrovského množstva vektorových partikul nastáva u príjemcu mohutná imunologická odpoveď s tvorbou protilátok proti AAV kapside. U 7 pacientov s hemofíliou B, ktorí dostali

AAV2 vektor v dávkach 8×10<sup>10</sup>–2×10<sup>12</sup> vg (vektorových genómov)/kg sa potvrdila dlhodobá perzistencia vysokého titra protilátok s multi-sérotypovou skríženou reaktivitou, u 4 pacientov dokonca aj 12–15 rokov po aplikácii, bez znakov hepatotoxicity alebo hepatocelulárneho karcinómu [9]. Perzistujúce protilátky predstavujú prekážku opakovanej aplikácie gébovej terapie.

Rovnako ako sérotyp, pri GT je dôležitá aj veľkosť dávky vektora s ktorou súvisí hepatotoxicita, podmienená imunologicky spôsobenou deštrukciou hepatocytov. Rozptyl použitých dávok v klinických štúdiách je široký, od 2×10<sup>11</sup> vg/kg [3] až po 6×10<sup>13</sup> vg/kg [5]. Transitórne, mierne až stredné zvýšenie ALT (transaminitis), pozorované v 60 % prípadov za 4–12 týždňov po injekcii vektora, ustúpi po imunosupresívnej liečbe kortikosteroidmi v dávke 1mg/kg počas 2–3 mesiacov [1]. Hepatotoxicita u jedincov s hemofíliou B môže viesť k strate aktivity FIX, pri hemofílii A je situácia variabilná [10].

### MERANIE EFEKTU A BEZPEČNOSTI GÉBOVEJ TERAPIE U PACIENTOV S HEMOFÍLIU.

Na hodnotenie efektu gébovej terapie sa využívajú laboratorne a klinické ukazova-

tele. K nim patrí spoľahlivosť a variabilita odpovede, jej stupeň a trvanie, meraná aktivitou FVIII alebo IX v plazme, ročný výskyt krvácaní (ABR), spotreba koncentrátov koagulačných faktorov na profylaxiu a liečbu krvácaní, stav muskulo-skeletálneho zdravia meraný pomocou MRI a USG, ako aj hodnotenie kvality života [1].

Pri hodnotení bezpečnosti GT sa posudzuje výskyt hepatotoxicity, imunologickej odpovede na transgén a kapsidu, vznik iných ochorení a trombotických komplikácií, integrácia vektora do genómu hostiteľa, trvanie vektor neutralizujúcich protilátok, vznik inhibítorov, prípadne úmrtie pacienta.

### AKTUÁLNE KLINICKÉ ŠTÚDIE GÉBOVEJ TERAPIE

Od roku 2010 prebehol celý rad klinických štúdií gébovej terapie hemofílie, z ktorých však boli mnohé predčasne ukončené.

#### Génová liečba hemofílie B

Aktuálne prebiehajúce štúdie pri hemofílii B demonštruje tab. 1 [1,11]. Dve štúdie prešli už fázou 3 klinických skúšok. Pri oboch viedlo použitie transgénu FIX Padua k produkcii hemostatickej aktivity FIX. V štúdiu SPK-9001 (Spark&Pfizer) malo až 9 z 10 pacientov ABR 0, 8 pacientov bolo bez potreby substitúcie FIX.

**Tab. 2. Aktuálne prebiehajúce klinické štúdie s génovou terapiou pri hemofílii A [upravené podľa 1,13].**

	Názov	Sponzor	Vektor	Dávka vektora (vg/kg)	Fáza	Pac. (n)	FVIII (%)
			/cDNA FIX				(%)
1	BMN-270	BioMarin	AAV5-huFVIII SQ	6×10 <sup>13</sup>	3	112 17	1 rok: 42,9 % 2 roky: 24,4 %
2	SB-525	Pfizer (Sangamo)	AAV2/6hFVIII	ú.n.	3	20	ú.n.
3	SPK-8011	Spark	AAV Spark200	6×10 <sup>11</sup> –2×10 <sup>12</sup>	3	12	13–49 %
4	Bay-19429	Bayer	AAV hu37FVIII	ú.n.	1.2		ú.n.
5	Spark-8016	Spark	AAV Spark200	ú.n.	1.2		ú.n.
6	Spark-8016 inhib.	Spark	AAV Spark200	ú.n.	1.2		ú.n.
7	ET3	Express Th	HCC- lentivirus		1		
8	Go-8	UCL/St.Jude	AAV2/8-HLP-VIII-V		1		
9	YUVA-GT-F801	SGIMI	HCS / MSC-lenti-virus		1		
10	Pleightlet (MUT6)	MCW	Autol.CD34-lenti-virus		1		

HSC – hemopoietic stemm cells, MSC – mesenchymal stemm cells, ú.n. – údaj nedostupný, vg/kg – vektorových genómov/kg

**Tab. 3. Nezodpovedané známe i neznáme otázky gébovej terapie, ktoré vyžadujú pozornosť [10].****Otázky neznámej účinnosti gébovej terapie**

1. Neznáma stabilita a trvanie dosiahnutej aktivity faktorov. Sú rozdiely v stabilite pre FVIII a FIX?
2. Ktoré faktory sú kritické pre takmer 10-násobné inter-individuálne rozdiely odpovede pri rovnakej dávke vektora? Dajú sa rozdiely minimalizovať?
3. Ako liečiť pacientov so suboptimálnou odpoveďou, ktorí vyvinuli vysoké titre anti-AAV protilátok?
4. Ako liečiť pacientov po predošlej expozícii AAV, u ktorých protilátková odpoveď blokuje transdukciu hepatocytov a následnú expresiu transgénu?

**Nezodpovedané otázky bezpečnosti**

1. Aké sú príčiny zvýšenia transamináz? Ktorí pacienti sú na tieto zmeny citlivejší? Sú zmeny skutočne prechodné? Ako často sa majú transaminázy monitorovať?
2. Je so zvýšením transamináz spojený mierny zápal? Môže prispieť k vývoju fibrózy pečene? Je potrebné tlmiť cytotoxickú reakciu T-buniek?
3. Existujú neimunologické príčiny hepatotoxicity?
4. Aká je úloha steroidov počas prvého roku po liečbe? Malo by sa vykonávať profylaktické potlačenie imunity? Mali by sa skúšať iné imunosupresívne lieky?
5. Je distribúcia hepatocytov tvoriacich FVIII alebo FIX difúzna alebo koncentrovaná v špecifických oblastiach pečene? Sú niektoré bunky preťažené transgénnymi epizómami, zatiaľ čo iné bunky žiadne nemajú, a preto neexprimujú žiadny transgénný proteín?
6. Ako dlho zostáva vírusová kapsida v bunkách? Spôsobuje to toxicitu v dôsledku preťaženia mechanizmov na odbúravanie bielkovín?
7. Ako možno zvýšiť slabú transdukciu a znížiť dávky vírusového vektora?
8. Je možné medikamentózne účinne a bezpečne podporiť proces vírusového uvoľnenia transgénu a epizomálnej formácie?
9. Koľko transgéennej DNA sa integruje a v ktorej časti genómu? Aké sú bezpečnostné problémy spojené s integráciou a ako by sa mali monitorovať?

**Otázka evidencie nežiaducich a vedľajších účinkov gébovej terapie.**

1. Môže jeden globálny register všetkých jedincov s hemofíliou a GT efektívne sledovať tieto nepredvídané udalosti?

Jeden pacient mal pokročilú artropatiu a aj u neho sa ročná spotreba FIX znížila až o 91 %. Zvýšenie ALT sa pozorovalo

u 2 pacientov, s ústupom po kortikoterapii, ale u jedného z nich došlo k zníženiu aktivity IX [4]. Štúdiu AMT-061 (UniQure)

ukončilo 54 pacientov, 26 týždňov po liečbe bol FIX 37,2 ± 19,6%. Až 23 pacientov malo pred liečbou prítomné

anti-AAV5 protilátky, ktoré pri titri do 678.2 nemali vplyv na efekt GT, ale pacient s titrom 3212,3 neodpovedal na liečbu. Profylaxiu mohlo ukončiť až 52/54 pacientov, 39 pacientov malo ABR: 0 a u 15 pacientov vzniklo celkom 21 krvácaní. Z vedľajších účinkov, ktoré boli mierne, sa u 7 pacientov vyskytla bolesť hlavy a chrípkové ťažkosti, 9 pacientov dostávalo kortikoterapiu pre zvýšenie ALT [12]. Dáta tejto štúdie boli predložené v marci 2021 liekovým agentúram FDA a EMA.

### Génová liečba hemofílie A

U pacientov s hemofíliou A aktuálne prebieha 10 štúdií (tab. 2), z nich v najpokročilejšom štádiu pre hodnotenie účinnosti a bezpečnosti je štúdia BMN-270 [1,11]. V tejto štúdii dosalo 1 dávku vektora AAV5-huFVIII SQ s depletovanou B doménou v množstve  $6 \times 10^{13}$  vg/kg až 112 pacientov. V 2.–9. týždni bola hladina FVIII > 50 %. Priemerná hodnota ABR bola u pacientov < 1, GT viedla k > 90% redukcii krvácaní a 97% redukcii spotreby koncentrátov FVIII. 1 rok po GT bol medián hladiny FVIII 42,9 % a u 17 pacientov sledovaných 2 roky došlo k 50% poklesu hladiny na 24,4 %, bez prítomnosti hepatopatie [13]. Vysvetlením by mohla byť strata nadrozmerného AAV transgénu FVIII zadržaného v epizóme transdukovaných hepatocytov a umlčanie transgénu FVIII. Výsledky štúdie boli predložené agentúram EMA a FDA už koncom roka 2019, registrácia sa očakávala v roku 2020, posun udelenia licencie spôsobila pandémia COVID-19 [14].

Najnovším experimentom GT je ex vivo transdukcija génov pre syntézu FVIII alebo IX pomocou lentivírusového vektora do autológnych CD34 krvotvorných kmeňových buniek, separovaných z periférnej krvi. Geneticky ovplyvnené bunky sa budú aplikovať pacientovi intravenózne po redukovanom pred-transplantačnom prípravnom re-

žime, ktorý uľahčí ich prihojenie v kostnej dreni [1]. V súčasnosti prebieha Fáza 1 skúšok tohto spôsobu GT.

### PRÍPRAVA NA GÉNOVÚ TERAPIU

Génová terapia hemofílie prvej generácie, ktorá sa aktuálne podrobuje skúmaniu regulačnými autoritami, zníži alebo eliminuje záťaž choroby u mnohých pacientov, ktorí spĺňajú kritériá pre jej použitie. Táto liečba zásadne zmení paradigmu liečby hemofílie a treba sa na ňu dôkladne pripraviť. Z tohto dôvodu sa už dnes génovej terapii venuje veľká pozornosť na všetkých hemofilických medzinárodných odborných podujatiach a kreujú sa pravidlá tejto liečby [15]. Proces prechodu na GT bude vyžadovať dôkladnú edukáciu zdravotníckeho personálu ale aj pacientov. GT bude riadiť centrum hemofilickej komplexnej starostlivosti (HCCC), ktoré bude viesť register dlhodobej účinnosti a bezpečnosti liečby, a s ktorým budú úzko spolupracovať všetky hemofilické centrá nižšej úrovne.

### OTVORENÉ OTÁZKY GÉNOVEJ TERAPIE

V mnohých prípadoch však GT zatiaľ nie je možná, vrátane pacientov ktorí sú séropozitívni alebo majú multi-sérotypovú reaktivitu, u pacientov s inhibítormi a komorbiditami a zatiaľ sa GT neskúšala u detí, ktoré by z nej mohli najviac profitovať.

Napriek tomu, že sa GT už významne približuje k uvedeniu do praxe, stále zostáva veľa otvorených a nezodpovedaných otázok týkajúcich sa bezpečnosti, trvanlivosti a spoľahlivosti tejto liečby, ako ich zobrazuje tab. 3 [10]. Génová terapia ako paradigma liečby nastoľuje aj ďalšie dôležité otázky týkajúce sa budúcnosti liečby a starostlivosti o hemofíliu, ktoré sú značne rozdielne v rozvinutých a rozvojových krajinách sveta.

### Literatúra

- Batty P, Lillicrap D. Hemophilia gene therapy: approaching the first licensed product. *Hemisphere*. 2021;5(3):e540–e548.
- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*. 2000;24(3):257–261.
- Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011; 365,25:2357–2365.
- George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant. *N Engl J Med* 2017;377(23):2215–2227.
- Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med*. 2017; 377:2519–2530.
- Nair N, De Wolf D, Nguyen PA, et al. Gene therapy for hemophilia B using CB 2679d-GT: a novel factor IX variant with higher potency than factor IX Padua. *Blood*. 2021;137(21):2902–2906.
- McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood* 2013;121:3335–3344.
- Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 2013;122(1):23–36.
- George LA, Ragni MV, Rasko JE, et al. Long-term follow-up of the first in human intravascular delivery of AAV for gene transfer: AAV2-hFIX16 for severe hemophilia B. *Mol Ther*. 2020;28:2073–2082.
- Pierce, GF. Uncertainty in an era of transformative therapy for haemophilia: Addressing the unknowns. *Haemophilia*. 2021;27(suppl. 3):103–113.
- Miesbach W, Meijer K, Coppens M, et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 2018;131(9):1022–1031.
- Pipe SW, Recht M, Key NS. Efficacy and safety of etranacogene dezaparvec in adults with severe or moderate-severe hemophilia B: first data from the phase 3 HOPE-B gene therapy trial. *Blood* 2020;136:ABS089.
- Pasi KJ, Rangarajan S, Mitchell N, et al. Multiyear follow-up of AAV5-hFVIII-SQ gene therapy for hemophilia A. *N Engl J Med* 2020;382:29–40.
- BioMarin Pharmaceutical Inc. BioMarin Submits Biologics License Application to U.S. Food and Drug Administration for Valoctocogene Roxaparvec to Treat Hemophilia A. <https://investors.biomin.com/2019-12-23-BioMarin-Submits-Biologics-License-Application-to-U-S-Food-and-Drug-Administration-for-Valoctocogene-Roxaparvec-to-Treat-Hemophilia-A>.
- Konkle BA, Coffin D, Pierce GF, et al. World federation of hemophilia gene therapy registry. *Haemophilia* 2020;26:563–564.

## Novinky v léčbě nejen dětských hemofiliků

Komrská V., Zápotocká E.

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

**Souhrn:** Vrozená hemofilie A či B jsou v současné době dobře kontrolovatelné nemoci, a to pomocí koncentrátů koagulačních faktorů VIII a IX vyráběných rekombinantní technologií nebo z lidské plazmy, nověji také s využitím nefaktorové léčby. Tradiční koncentráty dokáží zastavit krvácení a dají se použít i k profylaktické léčbě, jejich společnými nevýhodami však jsou krátký poločas účinku a aplikace výhradně intravenózní cestou. Výzkum a vývoj léků na hemofilii šel jednak cestou prodloužení poločasu účinku koncentrátů koagulačních faktorů, jednak u nefaktorové léčby cestou využití jiných principů dosažení očekávané hemostázy, navíc s benefitem odstranění nutnosti intravenózní aplikace a snížením imunogenicity. Souběžně s tím pokračuje intenzivní výzkum a příprava genové léčby. Moderní léčba hemofilie staví pacienta do centra péče s maximálním důrazem na personalizaci péče, tedy se zohledněním jeho životního stylu, fyzické aktivity či již přítomného existujícího poškození kloubů, u starších hemofiliků také zohledněním přítomných komorbidit.

**Klíčová slova:** hemofilie – substituční léčba – koncentrát faktoru VIII a IX – poločas účinku – prodloužená doba účinku – bypassing preparáty – nefaktorová léčba – genová léčba – personalizace léčby

Hemofilie A a B jsou vrozená krvácivá onemocnění, jež mohou v nejtěžších formách vést k významným krvácivým projevům, které při nedostatečné léčbě mohou být invalidizující až život ohrožující. Historickým zlomem v péči o hemofiliky byla příprava koncentrovaného FVIII a FIX, jež umožnily efektivní léčbu krvácení a také zavedení tzv. profylaktické péče, tedy pravidelného podávání koncentrátů srážlivých faktorů s cílem konvertovat těžkou formu hemofilie na středně těžkou, a tímto předcházet řadě spontánních i traumatických krvácení. 21. století přineslo další, až revoluční léčebné přístupy, a díky novým technologiím umožnilo efektivnější dialog s nemocnými a současně také další vylepšení preventivní péče v ambulancích hemofilických specialistů.

### SUBSTITUČNÍ LÉČBA.

Současným pilířem léčby hemofilie jsou substituční preparáty, ať již vyrobené z krevní plazmy nebo rekombinantní technologií, se standardním nebo prodlouženým poločasem účinku. V ČR v současné době používáme u malé části pacientů koncentráty vysoké čistoty, vyráběné z plazmy, a je registrována řada rekombinantních preparátů FVIII a FIX. V případě koncentrátů vyráběných rekombinantní technologií jsou využívané technologie přípravy FVIII na ovariálních buňkách čínské křečka či na

tkáňových kulturách ledvinných buněk křeččích mláďat, některé procesy využívají humánní embryonální linie. Biochemické, farmakokinetické a klinické vlastnosti takto připravených produktů jsou prakticky stejné jako u koncentrátů vyráběných z plazmy, specifická aktivita je však mnohonásobně vyšší. Možnost přenosu lidské nebo zvířecí infekce je u novějších generací zcela vyloučena. V rekombinantní technologii je využívána celá genová informace FVIII či je odstraněna B doména (B-domain-deleted – BDD). V léčbě hemofilie B jsou k dispozici vysoce čištěné koncentráty FIX v lyofilizované podobě a taktéž rekombinantní koncentráty FIX třetí generace.

Bezpečnost substitučních preparátů zohledňuje mikrobiologickou bezpečnost a imunogenicitu, neboli schopnost indukovat tvorbu protilátky – inhibitoru. Z hlediska mikrobiologické bezpečnosti představují vrchol nabídky rekombinantní preparáty, z hlediska schopnosti indukovat tvorbu inhibitoru probíhá široká diskuze, zda nejsou rekombinantní preparáty více imunogenní než preparáty vyráběné z plazmy.

Zásadní nevýhodou substitučních preparátů užívaných klasicky do druhé dekády 21. století (tzv. produkty o standardním poločasu, standard half life – SHL) je jejich krátký poločas účinku – u FVIII 8–12 hodin, u FIX 18–24 hodin. Poslední 2–3 roky jsou v ČR k dispozici

také koncentráty FVIII/FIX s prodlouženou dobou účinku (extended half life – EHL). Prodloužení biologického poločasu lze dosáhnout několika způsoby:

- 1. FC fúze.** Fúze biologicky aktivního proteinu s FC doménou lidského IgG1 je spojena s ochranou proteinu před lysozomální degradací a prodloužením jeho biologického účinku. Rekombinantně vyrobený faktor VIII zbavený B domény je kovalentní vazbou navázán na FC doménu lidského IgG1. Ve studiích s těmito preparáty bylo prokázáno 1,6–1,7× prodloužení času eliminace a poločasu FVIIIc až na 19 hodin. Podobně ošetřená přirozená molekula FIX vykazuje více než trojnásobné prodloužení doby účinku a prodloužení poločasu až na 82 hodin.
- 2. Fúze s albuminem.** Albumin je v krvi přirozeně se vyskytující protein a jeho biologický poločas zde dosahuje více než 20 dnů. Je široce používán jako bílkovinný stabilizátor při výrobě řady léčiv. Rekombinantní FIX s navázaným rekombinantním albuminem (rIX-FP) dosahuje poločasu cca 4,3× delšího než u běžných preparátů FIX.
- 3. Pegylace.** Pegylace znamená kovalentní připojení polyethylen glykolu (PEG) k proteinu, peptidu nebo malé lékové molekule. Pegylace prodloužuje biologický poločas bílkovin několika mechanismy: A) zvětšením je-

jich molekuly; B) snížením jejich citlivosti k proteolytickému štěpení a degradaci a C) změnou vlastností povrchového elektrického náboje, čímž dochází k interferenci s procesy clearance. Pegylací ošetřený FVIII má ve srovnání s běžnými preparáty také cca 1,8× prodloužený biologický poločas. V současnosti jsou v ČR koncentráty FVIII či FIX s PEG povoleny pouze u pacientů starších 12 let.

**4. Polysialyzace (PSA).** Vazba koagulačního proteinu na kyselinu polysialovou vede k podobnému efektu jako pegylace a prodlužuje poločas účinku FVIII/FIX. Mezi novější produkty patří také jednořetězcový (single chain) rekombinantní FVIII, tvořený lehkým a těžkým řetězcem spojenými kovalentní vazbou. Tento faktor vykazuje zvýšenou afinitu k VWF, což umožňuje dosažení delšího poločasu ve srovnání s SHL.

Příchod EHL produktů umožnil řadě pacientů snížit frekvenci profylaktického podávání FVIII (typicky nyní každý 3. den či 2× týdně, u některých pacientů i podávané 1× za 5 dnů) při zachování stejné ochrany jako při frekventnější profylaxi s SHL produkty. U jiných nemocných se dá využít efektu dosažení vyšších minimálních (trough) hladin, jež jsou pro řadu aktivit výhodnější, při povětšinou zachování stejné frekvence aplikací jako při léčbě SHL preparáty. V případě EHL produktů FIX bylo možno dosáhnout frekvence aplikace 1× za 7–10 dnů (v některých případech i 14 dnů, popř. méně) v závislosti na krvácivých projevech.

Okrajem nutno podotknout, že modifikované EHL produkty mají svá laboratorní specifika, pokud jde o stanovení hladin faktorů a tato specifika (výběr reagens pro testy) je nutno zohlednit.

Nefaktorová léčba představuje zcela nový přístup k profylaxi u hemofilie. Efektivní hemostázy je dosaženo jiným způsobem než podáváním koncentrátů deficitních faktorů.

- Bispecifická protilátka emicizumab je namířená proti FIXa na jedné straně a proti FX na straně druhé, jejich vaz-

bou dojde k prostorovému sblížení obou faktorů a následné aktivaci FX na FXa. Bispecifická protilátka zde nahrazuje (mimikuje) funkci FVIII jako ko-faktoru, její poločas je 2–3 týdny, aplikuje se podkožně a efektivně funguje u hemofilie A s inhibítorem i bez inhibítoru. Data z klinických studií ukázala významné snížení počtu léčených krvácivých epizod ve srovnání s předchozí profylaxí koncentráty srážlivých faktorů. Je již v běžném klinickém použití a také data z reálné praxe potvrzují velmi dobrý potenciál prevence krvácení. V případě některých operačních výkonů či většího krvácení je potřeba podat jednorázově či krátkodobě koncentrát FVIII či u nemocných s inhibítorem by-passový lék. Dávkování emicizumabu se neliší napříč věkovými kategoriemi, je možno podávat 1× za 7 či 14 dnů, popřípadě 1× za 28 dnů. Jeho efekt přetrvává v těle až 6 měsíců po jeho vysazení. Emicizumab významně ovlivňuje některé laboratorní testy, což je také nutno držet v patrnosti.

- Inhibice přirozených antikoagulans při deficitu FVIII či FIX navozuje novou rovnováhu koagulačního systému a vede ke snížení tendence ke krvácení. Jedná se o látky zatím v klinickém vývoji – inhibiční protilátka proti TFPI (tissue factor pathway inhibitor) concizumab či se využívá krátkých interferujících RNA (si-RNA) k inhibici produkce antitrombinu (fitusiran). Tyto látky mají potenciál fungovat v případě hemofilie A i B i při přítomnosti inhibítoru FVIII či FIX. Jejich podávání je opět subkutánní cestou.

V terapii pacientů s inhibítorem se v současnosti používají tzv. bypassing preparáty, které aktivují FX na Xa i bez přítomnosti FVIII/FIX. V klinickém použití jsou v nezměněné podobě již řadu let preparáty aktivovaného protrombinového komplexu (aPCC – FEIBA) a rekombinantní aktivovaný FVII (NovoSeven). Jsou vyvíjeny nové molekuly rFVIIa (vazba s PEG, popřípadě využití variant rFVIIa).

Genová léčba hemofilie je nadějí pro všechny pacienty trpící hemofilií, s cílem

jednorázového podání a následného vyléčení hemofilie. Již od přelomu století probíhá intenzivní výzkum včetně klinických studií s různými formami virových vektorů a využitím různě upravené genové informace FVIII či FIX. Výsledky výzkumu i klinických studií jsou povzbudivé, nicméně před zavedením do klinické praxe je potřeba se více zaměřit na otázky spojené s managementem samotného podání genové terapie, přetrváváním exprese genu (roky vs. dekády), možností podání genové terapie u hemofiliků s inhibítorem, určením vhodného věku pro její podání apod.

## PŘÍSTUP K HEMOFILII VE 21. STOLETÍ

Moderní léčba hemofilie staví pacienta do centra péče, přičemž systém komplexních center a menších léčebných center umožňuje dobrou spolupráci a zajištění optimální péče, vč. péče multioborové. Profylaxe primární a sekundární je u hemofiliků s krvácivými projevy dnes již standardem péče, významně narůstá podíl nemocných s terciární profylaxí. Vedle dostupnosti nových léků a jejich zavádění do klinické praxe je zásadní jejich efektivní podávání a vhodná indikace. V případě profylaxe koncentrátů FVIII/FIX se v současnosti léčba často opírá také o farmakokinetické vyšetření (PK profil), jež je díky některým dostupným bayesiánským modelům (např. akademický projekt WAPPs HEMO) dobře proveditelné i při omezeném množství odebraných vzorků. Cílem je nastavit profylaxi tak, aby co nejlépe vyhovovala životnímu stylu daného jedince či míře poškození jeho kloubů, popřípadě již existujícím přidruženým onemocněním. V dialogu s pacienty mohou pomoci aplikace do chytrých telefonů, jež využívají PK profil, zlepšují edukaci hemofiliků a jejich rodin a současně zvyšují v řadě případů adherenci k léčbě. Detekci častného, zatím i subklinického, poškození kloubů pomáhá bedside ultrazvukové vyšetření v rukou hematologa či ortopeda, jež je v řadě pracovišť v ČR již také k dispozici.

Všechny pokroky a nové trendy v přístupu k hemofilii také reflektují péči o přenašečky, zajištění prenatalní a postnatalní péče o děti s hemofilii, časné stanovení diagnózy hemofilie, edukaci rodin a brzké zahájení efektivní profylaxe u řady dětí. Na druhé straně pak stojí stárnoucí populace hemofiliků a hledání optimálního nastavení jejich léčby ve vztahu k chorobám spojeným se stárnutím.

Třetí vydání Doporučení Světové hemofilické federace (WFH) z roku 2020 pak navrhuje novou definici profylaxe jako pravidelné podávání hemostatické či jiné látky s cílem prevence krvácení hemofiliků s možností pomoci vést aktivní život a dosáhnout kvality života

srovnatelné s lidmi bez hemofilie. Zda toto bude možnou realitou pro většinu hemofiliků, ukáže blízká budoucnost.

### Literatura

1. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, et al: Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1935–1939.
2. Oldenburg J. Optimal treatment strategies for hemophilia: achievement and limitations of current prophylactic regimens. *Blood.* 2015;125(13):2038–2044.
3. Mannucci PM. Haemophilia therapy: the future has begun. *Hematologica.* 2020;105(3):545–553.
4. Collins P, Chalmer E, Chowdary P, et al. The use of enhanced half-life coagulation factor concentrates in routine clinical practice: guidance from UKHCDO. *Haemophilia.* 2016;22(4):487–497.

5. Massimo F, Mannucci PM. Non-factor replacement therapy for haemophilia: a current update. *Blood Transfus.* 2018;16(5):457–461.
6. Franchini M, Marano G, Pato I et al. Emicizumab for the treatment of haemophilia A: a narrative review. *Blood Transfus.* 2019;17(3):223–228.
7. Batty P, Lillicrap D. Advances and challenges for haemophilia gene therapy. *Hum Mol Genet.* 2019;28(R1):R95–R101.
8. Iorio A, Blanchette V, Blatny J, et al: Estimating and interpreting the pharmacokinetic profiles of individual patients with hemophilia A or B using a population pharmacokinetic approach: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2017;15(12):2461–2465.
9. Rodrigues C, Rodriguez-Merchan EC, Alvarez-R MT, et al. The value of HEAD-US system in detecting subclinical abnormalities in joints of patients with hemophilia. *Expert Rev Hematol.* 2018;11(13):253–261.
10. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia.* 2020;1–158.

## Antitrombotická léčba u hemofiliků

Smejkal P.

*Katedra laboratorních metod, LF MU a Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

Se zlepšující se péčí o pacienty s hemofilií se prodlužuje délka jejich života; u pacientů s těžkou formou hemofilie výrazně přesahuje 60 let [1] a u středně těžké a lehké formy hemofilie se blíží normální mužské populaci. V péči o pacienty s hemofilií tak vyvstávají problémy obdobné nehemofilické stárnoucí mužské populaci – především kardiovaskulární onemocnění a malignity. O antitrombotické terapii se první systematictější práce v literatuře objevují od roku 2009. Do té doby se jednalo jen o publikace kazuistik. Nejčastěji je v literatuře odkazováno na práci italských a holandských autorů publikovanou v roce 2009 v *Blood* [1]. V doporučení Světové federace hemofilie (WFH) se podrobnější doporučení pro antiagregační a antikoagulační léčbu objevují až v poslední třetí edici z roku 2020 [2]. V roce 2012 je zmíněn jen jeden odstavec o léčbě antiagregační – v poslední edici se již jedná o několik stránek.

Výskyt idiopatické žilní trombembolické nemoci (TEN) je u pacientů s hemofilií velmi vzácný. Většinou se jedná o žilní trombembolismus asociovaný se substitucí koagulačního faktoru při chirurgických výkonech, případně ve spojení s léčbou krvácení. Historicky bylo riziko TEN vyšší u pacientů s hemofilií B léčených koncentráty protrombinového komplexu (PCC), což již neplatí. Tito pacienti jsou nyní léčeni výlučně koncentráty koagulačního faktoru IX (FIX). Projevy TEN a diseminované intravaskulární koagulace byly popsány i při léčbě vyššími dávkami aktivovaného protrombinového komplexu (aPCC) u hemofilie s inhibitorem a recentně pak při profylaktické léčbě emicizumabem a současné léčbě aPCC [2]. Perioperační výskyt TEN je u hemofiliků sice nižší, ale není nulový. U náhrad kyčelních a kolenních kloubů je popsána incidence symptomatické TEN 0,5 % (většinou bez farmakologické profylaxe TEN) oproti 4,3 % u běžné

populace [3]. Podle doporučení WFH je u chirurgických výkonů vždy potřeba individuálně zvážit riziko krvácení a riziko TEN a dle toho použít profylakticky dávkovanou antikoagulaci, což je v praxi profylaktická dávka LMWH. Toto platí pro pacienty bez inhibitoru. U pacientů s inhibitorem je antikoagulace vč. profylaktické dávky považovaná za kontraindikovanou [2], a pokud byly popsány kazuistiky TEN ve spojení s léčbou bypasovými aktivitami, tyto nebyly léčeny antikoagulací, ale přerušением podávání bypasových aktivit – pro omezení počtu citací je bohužel zde nelze vyjmenovat.

Pokud se u hemofilie bez inhibitoru vyskytne žilní TEN, je doporučeno podat terapeutickou antikoagulaci po jen nezbytnou dobu – u provokované TEN na 6–8 týdnů, nejméně však po dobu jednoho měsíce [3], za patřičné substituce koagulačního faktoru. Při léčbě terapeutickou dávkou heparinu pracovní skupina expertů „ADVANCE Working Group“



navrhla na základě delfské metody minimální hladinu FVIII/IX 40 %, ale se širokým rozpětím mezi jednotlivými experty 10–80 % [4]. WFH [2] zmiňuje pro veškerou terapeutickou antikoagulační léčbu prahovou hladinu FVIII/IX > 30 % s možností hladiny i jen > 15 % na základě citace Martin a Key [3], kteří však ve své práci toto jen extrapolují na základě toho, že pacienti s hladinou FVIII nad 15 % jsou bez spontánního krvácení a v kazuistice pacienta s fibrilací síní a hladinou FVIII 17 % připouští zvažít s ohledem na krvácivý fenotyp s opatrností použít v léčbě i warfarin. Standardně však i oni doporučují prahovou hladinu pro antikoagulaci 30 %. Nejčastější shoda dle literatury je tedy na hladině FVIII/FIX nad 30 % při léčbě terapeutickou dávkou heparinů.

Pro trombolytickou léčbu bylo navrženo udržovat hladinu FVIII/FIX na normální hladině 80–100 % a následně nejméně dalších 24–48 h od jejího ukončení, a to nejlépe formou i.v. kontinuální infuze [1].

Pro hemofilii s inhibitorem se antikoagulace všeobecně nedoporučuje [2]. Byla však popsána kazuistika šestiletého dítěte s intrakardiálním trombem při centrálním venózním katetru po léčbě by-passovými aktivitami, která byla léčena zahájením profylaktické aplikace emicizumabu ve standardní dávce a nízkomolekulárním heparinem po 4 týdnech podávání emicizumabu, nejprve s cílem profylaktické hladiny aktivity anti-Xa, následně pak i s dosažením terapeutické hladiny anti-Xa 0,5–0,7 IU/ml [5].

Podrobnější doporučení a více zmínek v literatuře je pro léčbu fibrilace síní a ischemické choroby srdeční, což je problém týkající se několikanásobně většího počtu hemofiliků než v případě TEN. Je to dáno především prodlužováním délky života hemofiliků: např. dle údajů z Velké Británie se mezi lety 1998 a 2018 zvýšil počet žijících pacientů s těžkou formou hemofilie A ve věku 60–74 let asi 2x a ve skupině nad 75 let o necelou polovinu [6].

Ve vyšší věkové skupině narůstá prevalence fibrilace síní: pod 55 let věku je

**Tab. 1. Distribuce endogenního trombinového potenciálu (ETP) dle PT INR a tíže hemofilie A [8].**

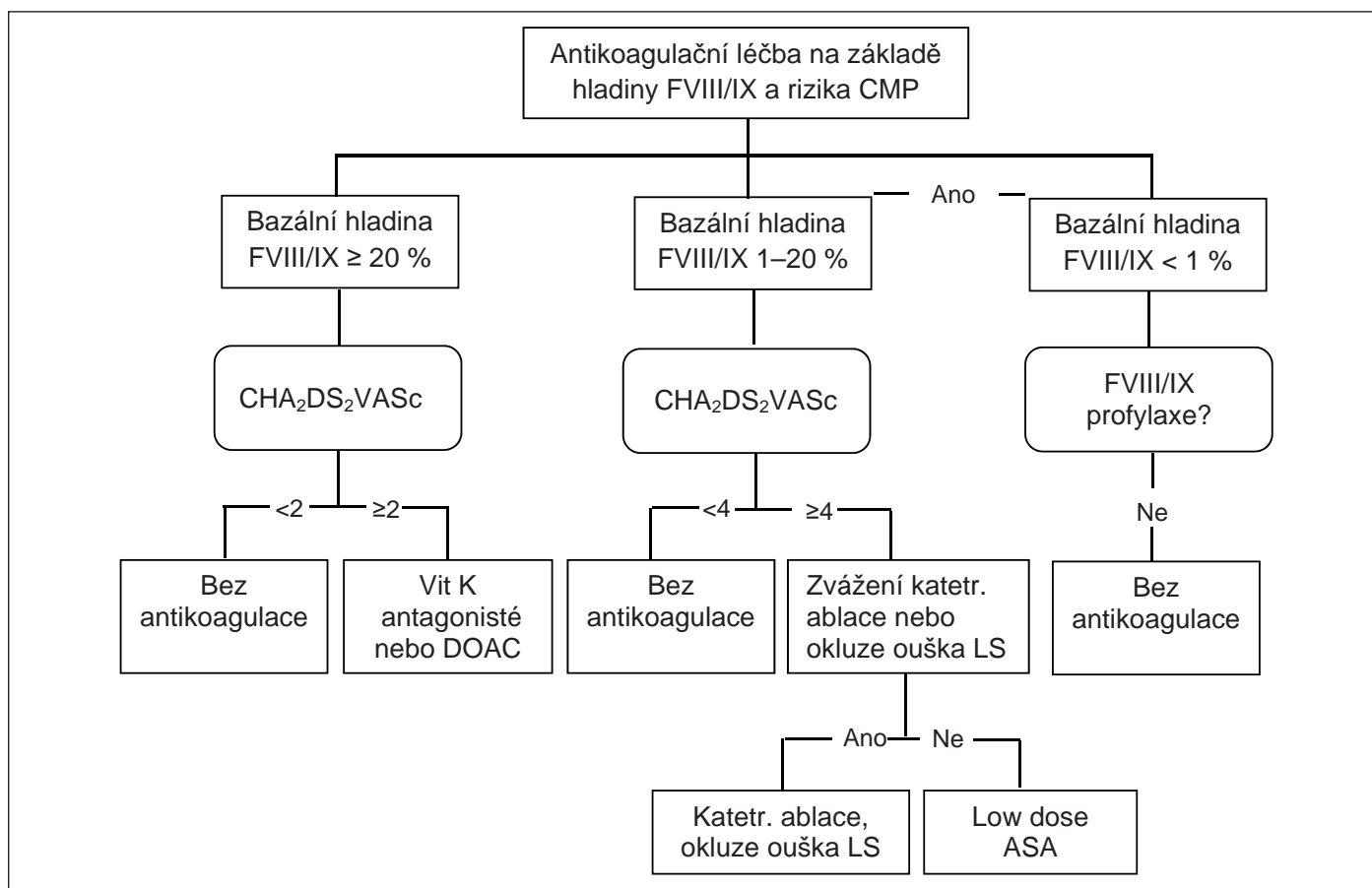
	ETP medián (nmol/l × min) 25.–75. percentil	ETP < 400 (nmol/l × min)
Zdravé kontroly	898 (803–1 004)	0 %
INR 1,5–1,9	340 (238–429)	63 %
INR ≥ 2	156 (90–225)	100 %
FVIII < 1 %	185 (116–307)	93 %
FVIII 1–19 %	296 (203–403)	70 %
FVIII 20–50 %	397 (219–632)	52 %

tato < 0,1 %, ale ve věku 65–69 let je 3 % a ve věku > 80 let je 9 % [2]. Nejnovější odhady celkové prevalence fibrilace síní v běžné populaci jsou až 2 % [6]. V normální populaci je indikace antikoagulace u pacientů s fibrilací síní posuzována dle CHA2DS2-VASc skóre, antikoagulace je indikovaná při skóre ≥ 2 a při skóre 1 lze antikoagulaci zvažít, ale není nezbytná, i když přibývá informací, že pro prevenci kardioembolizační cévní mozkové příhody (CMP) je prospěšná i u těchto pacientů. Při nulovém skóre se antikoagulační ani antiagregační léčba nedoporučuje, je považována dokonce za škodlivou [7]. Dříve pro pacienty se skórem 1 bod doporučovaná antiagregační léčba acetylsalicylovou kyselinou (ASA) není v současnosti považována za dostatečně účinnou [7]. Riziko krvácení je posuzováno dle HAS-BLED skóre i dle dalších skórovacích systémů, které ale zcela nezohledňují hemofilii a riziko krvácení tak u hemofiliků podhodnocují. Současně i CHA2DS2-VASc skóre nemusí zohledňovat reálné riziko kardioembolizační CMP při výraznějším deficitu FVIII/FIX. Protože oba tyto skórovací systémy nebyly validovány u pacientů s hemofilií, nejsou zatím důkazy, zda jsou stejným způsobem použitelné i pro pacienty s hemofilií [2,3].

U těžké formy hemofilie je generace trombinu přibližně na úrovni pacientů plně antikoagulovaných warfarinem. Dle práce holandských autorů [8] byla srovnána celková generace trombinu – endogenní trombinový potenciál (ETP) u pacientů s těžkou hemofilií A, pacientů

s hladinou FVIII 1–19 % a 20–50 % a pacientů antikoagulovaných warfarinem s PT 1,5–1,9 INR a ≥ 2 INR. Výsledky jsou uvedeny v tab. 1. Všichni pacienti léčení warfarinem s účinným PT ≥ 2 INR měli ETP < 400 nmol/l × min, což mělo i 93 % pacientů s těžkou formou hemofilie A, 70 % hemofiliků s hladinou FVIII 1–19 % a 52 % s hladinou FVIII 20–50 %. Lze tedy akceptovat fakt, že pacienti s těžkou formou hemofilie, pokud nejsou na profylaktické aplikaci koncentrátů FVIII/IX, jsou přirozeně terapeuticky antikoagulováni a nevyžadují při fibrilaci síní antitrombotickou léčbu. Pro obdobný fenotyp hemofilie A a B lze výsledky této práce extrapolovat i na hemofilii B.

Pokud se jedná o hemofiliky s hladinou FVIII/IX ≥ 20 %, je medián generace trombinu na základě dat uvedených v tabulce mírně vyšší než při subterapeutickém INR 1,5–1,9, ale u cca poloviny pacientů se překrývá s pacienty účinně antikoagulovanými s INR ≥ 2 a u většiny pacientů z druhé poloviny nedosahuje normálních hodnot. U pacientů s hladinou FVIII 1–19 % mělo 70 % z nich generaci trombinu obdobnou pacientům s terapeutickým PT INR. Původní doporučení pro bezpečnost antikoagulační terapie warfarinem u pacientů s hemofilií uváděla za bezpečnou hladinu FVIII/IX ≥ 30 % [1,3], novější práce udávají bezpečnou hladinu pro p.o. antikoagulaci 20 % [9,10]. To podpořila Francouzská prospektivní case-control study COCHE, která nenašla statisticky významný rozdíl v počtu závažných krvácivých epizod u pacientů na antitrombotické léčbě



Obr. 1. Doporučení pro antitrombotickou terapii u pacientů s hemofilií s fibrilací síní [9].

(antikoagulace, antiagregace mono či duální) s hladinou FVIII/IX > 20 %, i když jejich výskyt byl vyšší: v normální populaci byl nulový a u pacientů s hladinou FVIII/IX 21–30 % byl 3/13 a s hladinou FVIII/IX > 30 % byl 1/7 [11]. V guidelines WFH [2] je jako doporučená hladina FVIII/IX pro p.o. antikoagulaci u fibrilace síní uvedená stejná hladina jako pro léčbu TEN: ≥ 15–30 %. Je zajímavé, že pro snížení prahu FVIII/IX na 15 % není v guidelines WFH uvedena jiná citace než již výše zmíněná [3], která se opírá o extrapolaci, a ne o reálná data, která jsou dostupná pro prahovou hladinu FVIII/IX 20 % [9–11]. Současně je však vhodné podotknout, že i když ve studii COCHE frekvence závažných krvácivých epizod u pacientů s hladinou FVIII/IX 21–30 % na antikoagulační či antiagregační terapii nedosáhla statistické významnosti oproti normální populaci, závažné krvácivé epizody zde byly popsány; jednalo se o 3 epizody u třinácti pacientů, což je 23 % [11]. Zda použít antagonisty vitamínu K nebo přímá orální antikoagu-

lancia je dle guidelines WFH [2] na individuálním zvážení. Vzhledem k vyššímu bezpečnostnímu profilu dabigatranu v nižší dávce 2× 110 mg denně oproti warfarinu [7,9] se pro dostupnost jeho antidota jeví tento jako ideální pro p.o. antikoagulaci u pacientů s hemofilií, zejména s hemofilií B, kde vzhledem k defektu FIX bude hemofilií prohlouben warfarinem medikamentózně navozený deficit funkčního FIX. Na pracovišti tuto léčbu již několik let bez komplikací používáme u pacienta s fibrilací síní a hemofilií B s hladinou FIX 19 %. Předběžně se zdá výhodné při fibrilaci síní pro p.o. antikoagulaci u pacientů s hemofilií použít i apixaban, u kterého je udáváno méně intrakraniálních krvácení oproti rivaroxabanu při stejné účinnosti v prevenci kardioembolizační CMP [7,10]. Bude však vhodné vyčkat, až bude pro xabany dostupné antidotum. V souhrnu lze tedy pro antitrombotickou léčbu u fibrilace síní konstatovat:

- pacienti s těžkou formou hemofilie bez profylaktické léčby koncentráty FVIII/IX

jsou již antikoagulovaní přirozeně a antitrombotickou terapii nevyžadují;

- pro pacienty s hladinou FVIII/IX ≥ 20 % lze použít p.o. antikoagulaci warfarinem či DOAC za preference dabigatranu (pro dostupnost antidota) v dávce 2× 110 mg s její indikací dle CHA2DS2-VASc skóre jako u normální populace ≥ 2 a při nižším skóre ponechat bez antitrombotické terapie [9];
- pro pacienty s hladinou FVIII/IX 1–20 % vč. těžkých hemofiliků na profylaktické aplikaci FVIII/IX bylo navrženo vzhledem k riziku krvácení léčit pacienty dle CHA2DS2-VASc skóre až při hodnotě ≥ 4 [6,9] nízkou dávkou ASA a při skóre < 4 antitrombotickou terapii nepodávat vzhledem k poměrně nízké generaci trombinu při hladině FVIII 1–19 % [8] i na základě recentních kardiologických doporučení a nedostatečném efektu ASA v prevenci CMP u nízkého rizika dle CHA2DS2-VASc skóre [7], které je však, jak uvedeno výše, na rozdíl od normální populace zvýšeno při

hladině FVIII/IX < 20 % z jednoho až do tří bodů;

- pokud je trvalá antitrombotická terapie nemožná a je vysoké riziko kardioembolizační CMP dle CHA2DS2-VASc skóre, jak je uvedeno výše, je doporučena katetrizační ablace [6,9] či okluze ouška levé síně [2,7,9,10] za krátkodobé substituce koagulačními faktory;
- ani recentní guidelines WFH [2] pro pacienty na profylaktické léčbě emicizumabem nedávají pro antitrombotickou léčbu při fibrilaci síní žádné doporučení. Emicizumab by měl mimikovat aktivitu FVIII 10–15 %, tedy dle mého osobního názoru u pacientů léčených emicizumabem by bylo racionální postupovat jako u pacientů s hladinou FVIII/IX 1–20 %, jak je uvedeno výše;
- u pacientů s inhibitorem FVIII/IX, kteří nejsou na profylaktické léčbě emicizumabem, je antikoagulační i antiagregační léčba kontraindikovaná [2].

Schéma doporučení pro antitrombotickou léčbu u hemofilie s fibrilací síní je uvedeno na obr. 1 dle publikace [9], která vyšla jako doplnění k předchozí publikaci [3].

Nutnost antitrombotické léčby je v i v případě projevů ischemické choroby srdeční. Výskyt aterosklerózy koronárních tepen je u pacientů s hemofilií pravděpodobně obdobný jako v normální populaci [2]. Z rizikových faktorů aterosklerózy je v hemofilické populaci vyšší výskyt hypertenze 22,6 vs. 15,5 % v běžné populaci a hyperlipidémie 15,9 vs. 11,9 % v běžné populaci, ale prevalence ICHS je u hemofiliků nižší, v italské studii 17 : 24 % v běžné populaci a v americké studii 15 % u těžké a středně těžké hemofilie oproti 25,8 % v běžné populaci. Úmrtí v důsledku ICHS je dle britské studie u hemofiliků redukováno na 62 % oproti normální populaci [6]. Pacienti s hemofilií tedy nejsou chráněni před aterosklerózou, ale jsou částečně chráněni před úmrtím na akutní koronární syndrom.

V doporučení WFH [2] pro kardiovaskulární choroby u pacientů s hemofi-

lií bez inhibitoru je léčit stejným způsobem jako v běžné populaci a současně substituovat chybějící koagulační faktor. Pro pacienty s inhibitorem je doporučení limitované na antitrombotické terapie pro pacienty, u nichž riziko nepodání antitrombotické terapie převyšuje riziko krvácivých komplikací. Pro pacienty léčené profylakticky emicizumabem není uvedeno žádné doporučení s tím, že je nutný další výzkum bezpečnosti antitrombotické terapie u těchto pacientů [2].

Při mono-antiagregační terapii bylo původní doporučení Mannucciho udržovat hladinu FVIII/IX  $\geq 5$  % [1], následně dle pracovní skupiny ADVANCE [4] byla doporučena prahová hladina 3,5 % se širokým rozptylem doporučení jednotlivých expertů: 1–10 %. Dle novějších doporučení [2,3,6] je tato léčba doporučena při hladině FVIII/IX > 1–5 % za současné léčby inhibitory protonové pumpy a po individuálním zvážení krvácivého fenotypu pacienta.

Duální antiagregační terapie byla původně doporučena při hladině FVIII/IX  $\geq 30$  % [1], dle skupiny ADVANCE [4]  $\geq 14$  % při rozptylu mezi jednotlivými odborníky 4–30 %. Dle současného doporučení WFH [2] je duální antiagregace možná při hladině FVIII/IX  $\geq 15$ –30 % a dle některých autorů je přípustná i při hladinách  $\geq 5$ –15 % [6,12], při kterých ale byly popsány krvácivé komplikace u dvou ze 17 pacientů. Byla popsána i kazuistika s krvácením při prahové hladině FVIII > 15 %, které ustalo s navýšením prahové hladiny > 20 % [12]. Martin a Key doporučují prahovou hladinu  $\geq 10$ –15 % [3]. Opět je nutná současná antiulcerózní terapie. Lze tedy shrnout, že použití duální antiagregace by mělo být relativně bezpečné při hladinách FVIII/IX  $\geq 15$ –20 %, což podporují i data z francouzské studie COCHE [11], která uvádí statisticky významně vyšší výskyt závažného krvácení (major bleeding) oproti obdobně léčené běžné populaci při antitrombotické terapii (antikoagulační či antiagregační) při hladinách FVIII/IX  $\leq 20$  %,

zatímco u hladin vyšších byl rozdíl statisticky nevýznamný. Krátkodobě lze připustit i prahovou hladinu FVIII/IX  $\geq 5$  %. Z thienopyridinových preparátů je pro pacienty s hemofilií preferován clopidogrel pro nižší výskyt krvácivých komplikací při použití v běžné populaci oproti prasugrelu a ticagreloru [12].

V případě perkutánní koronární intervence (PCI), kdy se kombinuje duální antiagregace s terapeutickou dávkou heparinu, případně s krátkodobou aplikací inhibitorů destičkového glykoproteinu IIb/IIIa, je nutno udržovat hladinu FVIII/IX  $\geq 80$  %, resp. 80–100 % po dobu intervence [1–3,6,12] a následujících 48 h formou kontinuální i.v. infuze [3,12], připuštěna je po ukončení PCI při bolusové aplikaci koncentrátu koagulačního faktoru i prahová hladina FVIII/IX > 30 % [3,12]. Upřednostňuje se přístup cestou arteria radialis před arteria femoralis pro možnost snazší komprese. Pro následnou duální antiagregaci pak platí doporučení, jak je uvedeno výše. Při implantaci koronárního stentu se upřednostňují lékové stenty nové generace, které již nevyžadují dlouhodobou duální antiagregaci a tato je postačující po dobu jednoho měsíce.

Obdobná cílová hladina FVIII/IX 80–100 % je i pro operaci koronárního bypassu a platí zde doporučení obdobné jako pro velké operace [2].

Bohužel nelze poskytnout doporučení pro léčbu ICHS pro pacienty s inhibitorem, nedává je ani doporučení WFH [2]. Bez profylaktické léčby je u těchto pacientů jakákoli antitrombotická léčba kontraindikovaná. Podávání bypasseových aktivit riziko trombózy zvyšuje, tedy není racionální z důvodu umožnění antitrombotické terapie. Nadějí může být profylaktická léčba emicizumabem, který mimikuje hladinu FVIII 10–15 % a může umožnit v případě nutnosti jistý stupeň antitrombotické terapie. Zatím však pro tuto neexistují žádná doporučení.

Všechna výše uvedená dosud publikovaná doporučení pro antitrombotickou léčbu u hemofiliků jsou založena více

na zkušenostech expertů a publikovaných kazuistikách než na medicíně založené na důkazech. Antitrombotickou léčbu u hemofilie je nutno vždy individuálně přizpůsobit s ohledem na kalkulaci jejího přínosu pro pacienta a rizika krvácení.

### Literatura

1. Mannucci PM, Schutgens RE, Santagostino E, Mauser-Bunschoten EP. How I treat age-related morbidities in elderly persons with hemophilia. *Blood*. 2009;114:5256–5263.
2. Srivasta A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia 3rd edition. *Haemophilia*. 2020;26(S6):1–158.
3. Martin K and Key NS. How I treat patients with inherited bleeding disorders who need anticoagulant therapy. *Blood*. 2016;128(2):178–184.

4. Schutgens RE, Klamroth R, Pabinger I, et al. Management of atrial fibrillation in people with haemophilia – a consensus view by the ADVANCE Working Group. *Haemophilia*. 2014;20:e399–e443.

5. Weyand AC, Pipe SW. Emicizumab prophylaxis to facilitate anticoagulant therapy for management of atrial thrombosis in severe haemophilia with an inhibitor. *Haemophilia*. 2019;25:e203–e205.

6. Kempton JC, Makris M, Holme PA. Management of comorbidities in haemophilia. *Haemophilia*. 2021;27(Suppl 3):37–45.

7. Čihák R, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. Summary of the document prepared by the Czech Society of Cardiology. *Cor et Vasa*. 2016;58:e636–e683.

8. De Koning ML, Fischer K, de Laat B, et al. Comparing thrombin generation in patients with hemophilia A and patients on vitamin

K antagonists. *J Thromb Haemost*. 2017;15(5):868–875.

9. Schutgens RE, van der Heijden JF, Mauser-Bunschoten EP, Mannucci PM. New concept for anticoagulant therapy in persons with hemophilia. *Blood*. 2016;128:2471–2474.

10. Khan S, Krishnaswamy R, Malik BH, et al. Comparing safety and efficacy of dabigatran and factor Xa Inhibitors for stroke prevention in hemophiliacs with non-valvular atrial fibrillation. *J Atr Fibrillation*. 2019;12(4):2157.

11. Guillet B, Cayla G, Lebreton A, Trillot N, et al. Long-term antithrombotic treatments prescribed for cardiovascular diseases in patients with hemophilia: results from the French registry. *Thromb Haemost*. 2021;121(3):287–296.

12. Jabbar AY, Baydoun H, Janbain M, Ferdinand KC. Current concepts in the management of stable ischemic heart disease and acute coronary syndrome in patients with hemophilia. *Ann Transf Med*. 2018;6(15):299–305.

## Méně časté vrozené krvácivé choroby

Dulíček P.

*IV. Interní hematologická klinika LF UK a FN Hradec Králové*

Krvácivé choroby lze dělit na vrozené a získané nebo obojí. Vrozených krvácivých chorob je méně než získaných. Nejčastější a nejnámější vrozené krvácivé choroby jsou hemofilie a von Willebrandova choroba. V našem sdělení se ale chceme zabývat méně častými vrozenými onemocněními. Po teoretické části o frekvenci výskytu v populaci, diagnostice a léčbě se zamě-

říme na vlastní soubor 35 nemocných s vrozenými deficity koagulačních faktorů (KF). Jedná se o 6 jedinců s deficitem FXI, 3 nemocné s deficitem FV, 16 s deficitem faktorů kontaktní fáze, o 9 jedinců s deficitem FVII a v jednom případě o kombinovaný deficit FV a FVIII. U každého deficitu je zhodnocen klinický fenotyp, samostatně jsou pak hodnoceny operační výkony. Sa-

mostatnou kapitolou jsou defekty kontaktní fáze, které jsme sem zařadili přesto, že nejde o krvácivou chorobu (přes velké obavy lékařů pro signifikantní prodloužení aPTT), ale ani o trombofilní stav. Předmětem sdělení nejsou vrozené trombocytopenie a trombocytopenie, protože poruchy primární hemostázy jsou svojí vlastní kapitolou.

## Získaná hemofilie

Gumulec J.

*Klinika hematologie LF Ostravské univerzity a FN Ostrava*

### ÚVOD

Získaná hemofilie A (AHA) je vzácně se vyskytující onemocnění manifestující se typicky spontánním krvácením u pacientů s negativní osobní anamnézou vý-

znamných krvácivých projevů. Incidence se podle hlášených případů odhaduje na 1 až 2 případy na 1 000 000 obyvatel za rok [1,2]. Medián věku v době diagnózy AHA je podle Evropského regis-

tru AHA (EACH2) 73,9 let a 57 % případů neprovokovaných graviditou tvoří muži. Pozdě diagnostikované onemocnění znamená trvání rizika závažného krvácení [1]. V reálné praxi je incidence AHA a podíl ne-

lčených pacientů velmi pravděpodobně vyšší, protože řada případů zůstane nepoznaná a část diagnostikovaných nemocných není nikde registrovaná.

AHA je důsledek autoimunitní odpovědi vedoucí k vytvoření autoprotilátek zaměřených proti funkčním epitopům koagulačního FVIII. Výsledkem je blokáda aktivace nebo akcelerace clearance FVIII [3]. Ve výsledcích základního laboratorního vyšetření se snížení aktivity FVIII projevuje izolovaným prodloužením aktivovaného parciálního tromboplastinového času (APTT). Nevysvětlené krvácení plus izolované prodloužení APTT jsou signály pro bezodkladné provedení konfirmačních testů. Prokázání získané hemofilie A je důvodem pro bezodkladnou péči. V praxi to znamená hemostatickou léčbu nebo prevenci, eradikaci inhibitoru a individualizovanou podpůrnou péči. Zásadní význam pro úspěšnost péče mají identifikace a léčba onemocnění, které k AHA vede [3].

## KLINICKÁ A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

AHA se typicky projevuje spontánním krvácením u pacientů s doposud negativní osobní anamnézou významného krvácení [1,2,4]. Přibližně u 10 % pacientů se krvácení neobjevuje, naopak u 97 % případů bývá krvácení život ohrožující [1,4,5]. Objevují se rozsáhlé ekchymózy, krvácení do svalů nebo retroperitoneálně, epistaxe, hematurie, gastrointestinální i nitrolební krvácení [4]. Až 77,4 % krvácivých epizod se objevuje spontánně, resp. jen 10 % krvácení je vyvoláno úrazy, invazivními lékařskými zákroky nebo komplikacemi gravidity [1,4,5].

Příčinou krvácení je významný pokles aktivity FVIII navozený autoprotilátkami proti funkčním epitopům koagulačního FVIII, které tlumí jeho aktivaci nebo akcelerují jeho clearance [3]. Protílátky jsou nejčastěji polyklonální, liší se vlastnostmi vazebného místa [6], v 95 % jde o imunoglobuliny třídy IgG (zpravidla IgG4), až ve 46 % případů může být současně přítomno více typů autoprotilátek zaměřených

proti FVIII [3] a chování protilátek se může během imunosupresivní léčby měnit. Pacienti se sporadicky se vyskytujícími autoprotilátkami třídy IgA mají menší pravděpodobnost dosažení remise a vyšší mortalitu [6]. U polymorbidních pacientů se na krvácení může v době diagnózy AHA podílet i zavedená antitrombotická léčba [4].

Ve výsledcích základního laboratorního vyšetření se snížení aktivity FVIII projevuje izolovaným prodloužením APTT. Protrombinový čas, koncentrace fibrinogenu a počet krevních destiček jsou v referenčním rozmezí. Nevysvětlené krvácení plus izolované prodloužení APTT je signál pro bezodkladné provedení konfirmačních testů [3,4]. Všeobecně přijímaný algoritmus diferenciální diagnostiky izolovaného prodloužení APTT je následující: 1. vyloučení vlivu antikoagulantů na základní koagulační testy; 2. směsné testy s hodnocením APTT ratio bezprostředně po smíchání pacientovy a kontrolní plazmy, resp. APTT ratio po dvou hodinách inkubace směsi při 37 °C; a 3. rozšířená diagnostika podle výsledků směsných testů (průkaz inhibitoru FVIII a stanovení jeho titru nebo prokázání lupus antikoagulans, jiného nespecifického inhibitoru, resp. průkaz deficitu jiného koagulačního faktoru – FXII, FXI, FIX, FVIII a vWF:Ag) [4,7].

Diagnóza AHA je daná průkazem snížené aktivity FVIII v kombinaci s průkazem specifického inhibitoru FVIII. Kvantifikace titru inhibitoru může být komplikovaná díky jeho kinetice i díky zbytkové aktivitě FVIII. Klasická Bethesda metoda má řadu limitací, které částečně řeší její Nijmegen modifikace [8] nebo jiné postupy [4]. Existují ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) metody stanovení protilátek proti FVIII, které prokazují i FVIII neinhibující protílátky, což významně snižuje specifitu metody [1,4]. Velmi nízká aktivita FVIII (< 1 %) je spojována s nízkou pravděpodobností dosažení remise, resp. s vyšší celkovou mortalitou [6]. Podobně vysoký titr inhibitoru může být ukazatelem

menší pravděpodobnosti dosažení remise nebo pomalejšího nástupu odpovědi.

Z analýzy EACH2 registru vyplývá, že diagnóza AHA byla definitivně uzavřena u 37 % pacientů jeden den po první epizodě krvácení, u 26 % pacientů jeden týden po prvním krvácení, u 22 % případů po jednom měsíci a u 11,1 % případů po ještě delší době od prvního krvácení [1]. Pozdní diagnóza znamená pozdní nastartování hemostatické léčby a trvání rizika výskytu závažného krvácení. Dle EACH2 registru pozdě diagnostikované onemocnění negativně ovlivnilo úvodní léčbu u 33,5 % registrovaných pacientů tím, že až 29,5 % krvácivých epizod z celkového počtu 474 nebylo v úvodu zajištěno adekvátní léčbou [1,3].

## IDENTIFIKACI A LÉČBA ONEMOCNĚNÍ, KTERÉ K AHA VEDE

Identifikace a léčba onemocnění odpovědných za vytvoření protilátek proti FVIII má zcela zásadní význam pro strategii péče. Z EACH2 registru vyplývá, že 51,9 % případů AHA je idiopatických a že 11,8, resp. 11,6 % případů provází nějaké nádorové, resp. jiné autoimunitní onemocnění [1]. Vyšetření k vyloučení přítomnosti těchto spouštěčů, preferenčně neinvazivní, mají být prováděna co možná nejdříve po stabilizaci stavu. V nedávno publikovaném souboru pacientů s AHA a nádorem dominují nádory prostaty (25,3 %) a plic (15,8 %) následované nádory tlustého střeva (9,5 %). Pacienti se současným výskytem AHA a malignity mají ve srovnání s idiopatickou AHA častější krvácení a méně ochotně dosahují kompletní odpovědi s eradikací inhibitoru [9]. Předčasné přerušování imunosupresivní léčby indikované pro AHA u těchto pacientů je spojeno s vyšším rizikem rekurence AHA se všemi nežádoucími účinky, a naopak prolongovaná imunosuprese zvyšuje četnost závažných infekčních komplikací. Koordinovaná interdisciplinární spolupráce (hematolog, onkolog, revmatolog, chirurg

etc.) je v těchto případech nezbytnou podmínkou úspěchu.

## HEMOSTATICKÁ LÉČBA A PREVENCE KRVÁCENÍ

Každé poranění nebo narušení integrity organismu u pacientů s AHA vede bezprostředně k těžkému krvácení. Proto je naprosto nezbytné se všem zbytným invazivním zákrokům vyhnout, a jsou-li nutné, doporučuje se provádět je ve specializovaných zařízeních se zázemím expertů se zkušenostmi s léčbou pacientů s krvácivými nemocemi [3,4].

Při akutním krvácení je u pacientů s AHA indikovaná adekvátní hemostatická léčba [3]. Aplikace plazmy u pacientů s vysokým titrem inhibitoru (> 5 BU/ml) ani koncentrátů FVIII není opodstatněná, protože přítomné protilátky bezprostředně blokují podané množství FVIII [3,4]. Obecně doporučovaným přístupem je aplikace přípravků s bypassovou aktivitou, tzn. koncentrátů aktivovaných faktorů protrombinového komplexu (aPCC), rekombinantního humánního aktivovaného FVII (rhFVIIa) nebo rekombinantního porciního faktor VIII (rpFVIII) [4,5,7]. Zkušenosti s použitím emicizumabu u pacientů s AHA zatím není dostatek [4]. Pacient s mírným nebo žádným krvácením může také pro trvalý vysoké riziko závažného krvácení profitovat z hemostatické profylaxe. Dávkování přípravků s bypassovou aktivitou může být v těchto situacích menší, na zvážení je i rpFVIII (s in vivo monitorováním recovery, resp. trough hladiny) [3].

Obecně je doporučováno pokračování v hemostatické léčbě do spolehlivého zastavení krvácení [3]. To může být v případech některých typů a lokalizací krvácení (nitrosvalové, retroperitoneální, nitrolební...) obtížně hodnotitelné. Na rozdíl od publikovaného doporučení délky substituce u pacientů s vrozenou hemofilií k prevenci/léčbě krvácení kolem invazivních výkonů (malé výkony 1–5 dnů, velké operace 7–14 dnů) není v podobných klinických situacích u pacientů s AHA ověřené doporučení dostupné.

aPCC i rhFVIIa jsou v léčbě krvácivých epizod AHA srovnatelně účinné, k zastavě krvácení dochází u 93 % krvácivých epizod [5]. Nevýhodou obou léků je nemožnost spolehlivého laboratorního monitorování efektu u pacientů s AHA. Proto je nezbytné pečlivé klinické sledování přímých a nepřímých známek krvácení (nové nebo nově zvýrazněné bolesti, známky hemodynamické nestability, dyspepsie etc.) [3]. Laboratorní monitorování léčby koncentráty faktoru VIII na rozdíl od přípravků s bypassovou aktivitou je možné s tím, že vysoký titr inhibitoru může zvyšovat potřebu podávání velmi vysokých dávek koncentráty FVIII [3]. Přestože existují důkazy pro rychlejší eliminaci inhibitoru při podávání vysokých dávek FVIII, není pro pacienty s AHA klasická imunotolerance metoda volby [1,4].

Pro určité riziko rozvoje nebo zhoršení konsumpční koagulopatie (DIC) u pacientů léčených aPCC (zvláště u pacientů s preexistující DIC, s aktivním nádorovým onemocněním, s infekcí, s vyšším věkem, po úrazu nebo operaci, po podání bolusové dávky 100 U/kg, resp. denní dávky 200 U/kg) má být po dobu léčby prováděno laboratorní monitorování počtu destiček, koncentrace fibrinogenu, D-dimerů a aktivity antitrombinu. Ze stejného důvodu má být uvážlivě podávána kombinace aPCC s tranexamovou kyselinou [4].

Přesto, že pacienti s nízkým titrem inhibitoru a vyšší aktivitou FVIII mají pravděpodobnost spontánního krvácení menší, platí, že riziko významného krvácení trvá, pokud inhibitor není eradikován [7].

## ERADIKACE INHIBITORU

Druhým pilířem terapie AHA je vedle léčby nebo profylaxe hemoragických komplikací odstranění protilátek proti FVIII imunosupresivní léčbou [4]. Podle publikovaných zkušeností může až 37 % pacientů trpět závažnými nežádoucími účinky imunosuprese (leukopenie, těžké infekce a sepse, trombocytopenie, steroidní diabetes, psychóza etc.) s morta-

litou až 16 % [10]. Proto má být strategie imunosupresivní léčby individualizovaná podle přítomných prognostických markerů (aktivita FVIII a titr inhibitoru) a podle kondice pacienta (věk, přidružená onemocnění etc.) [4].

Nejčastěji používanou variantou imunosupresivní terapie AHA je kombinace kortikoidů (prednison 1 mg/kg/den na maximálně 4–6 týdnů s následným postupným vysazováním) s cyklofosfamidem (1,5–2 mg/kg/den per os maximálně 6 týdnů). Pro velmi dobrý účinek a akceptovatelnou toxicitu se do popředí stále více dostává rituximab (375 mg/m<sup>2</sup> jednou týdně celkem čtyřikrát) [4]. Možné je místo cyklofosfamidu podávat mykofenolát mofetil (1 g/den během týdne, dále 2 g/den) [4]. U pacientů s FVIII 1 % a více a titrem inhibitoru 20 BU a méně má být na první 3–4 týdny preferována monoterapie kortikoidy. Pro pacienty s aktivitou FVIII pod 1 % a titrem inhibitoru nad 20 BU má být v první linii podávána kombinace kortikosteroidu s rituximabem nebo cytotoxickou látkou. Trvá-li po 3–4 týdnech léčby první linie aktivita nemoci, má být ve druhé linii přidán rituximab nebo cytotoxický lék, nebyl-li podáván v první linii [4].

Podle EACH2 registru vedla monoterapie kortikoidy k léčebné odpovědi u 58 % léčených pacientů, kombinace kortikoidu s cyklofosfamidem v 80 % případů, resp. režimy s rituximabem u 61 % nemocných. Medián doby do kompletní odpovědi, tzn. trvání aktivity FVIII v referenčním rozmezí po ukončení imunosuprese, byl 32, 40, resp. 64 dnů. Nežádoucí účinky se objevovaly u 25, 41, resp. 37 % případů a mortalita asociovaná s imunosupresivní léčbou obecně byla 3,8 %.

U žen s AHA asociovanou s graviditou má být strategie imunosupresivní terapie stejná, indikace podání cytotoxických agens má být podána po zvážení všech rizik [4]. Je-li to možné, má být vyléčen stav nebo nemoc, která vedla k tvorbě protilátek. Specifickým přístupem u pacientů s refrakterním onemocněním provázaným závažnými hemoragickými projevy je využití imunoabsorpce s imu-

notoleranční léčbou, nebo bez, doplněná o substituci imunoglobulinů a současnou imunosupresi [4].

## INDIVIDUALIZOVANÁ PODPŮRNÁ PÉČE

Rozdíly v klinické manifestaci AHA, účinnosti různých modalit hemostatické léčby, resp. v účinnosti a toleranci imunosupresivní terapie, vyžadují individualizovaný přístup k monitorování pacientů i k podpůrné péči. V období zvýšeného rizika krvácení a hemostatické léčby/prevence musí být adekvátně krátké intervaly mezi jednotlivými kontrolami. Spektrum klinických a laboratorních vyšetření má být směřováno jak na krvácivé, tak na trombotické projevy. S určitým odstupem od zahájení imunosupresivní léčby musí být pozornost směřovaná na včasné odhalení nejobvyklejších nežádoucích účinků imunosuprese. Strategie péče musí respektovat individuální vlastnosti každého jednoho nemocného. Specifickou péči vyžadují křehcí a polymorbidní senioři, jiný přístup mladé ženy s postpartálně manifestovanou AHA, soustředěný přístup nemocní s refrakterní nebo relabující chorobou, pacienti vyžadující neodkladné provedení invazivních výkonů nebo pacienti vyžadující současně antitrombotickou terapii etc. Indikace farmakologické tromboprolaxe nebo terapie může být zvažována podle etab-

lovaných doporučení prevence trombóz po úpravě aktivity FVIII [4].

## DISPENZARIZACE

Po dosažení kompletní odpovědi je indikovaná dlouhodobá dispenzarizace. Vedle klinického sledování má probíhat pravidelné laboratorní monitorování aktivity FVIII: během prvních 6 měsíců v měsíčních intervalech, v následujících šesti měsících jednou za 2–3 měsíce, dále v půlročních intervalech [4].

## ZÁVĚR

Získaná hemofilie A je vzácně se vyskytující onemocnění manifestující se spontánním krvácením u pacientů s negativní osobní anamnézou krvácivých chorob. Jednoduchá základní diagnostika, velmi dobrá dostupnost a účinnost hemostatické léčby (pokles počtu případů fatálního krvácení z 20 % před rokem 1981 na 2,9 % v roce 2010 [7]) a konečně vysoký podíl kompletních remisí (dle EACH2 72,6 % pacientů z celkového počtu 477 léčených imunosupresivní terapií [1]) jsou důvody pro soustředěné vyhledávání pacientů a včasnou diagnostiku a léčbu.

## Literatura

1. Knoebl P, Marco P, Baudo F, et al. Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *J Thromb Haemost*. 2012;10(4):622–631. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04654.x.

2. Collins PW, Chalmers E, Hart D, et al. Diagnosis and management of acquired coagulation inhibitors: a guideline from UKHCDO. *Br J Haematol*. 2013;162(6):758–773. doi: 10.1111/bjh.12463.

3. Knoebl P. Prevention and management of bleeding episodes in patients with acquired hemophilia A. *Drugs*. 2018;78(18):1861–1872. doi: 10.1007/s40265-018-1027-y.

4. Tiede A, Collins P, Knoebl P, et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *Haematologica*. 2020;105(7):1791–1801. doi: 10.3324/haematol.2019.230771.

5. Baudo F, Collins P, Huth-Kuhne A, et al. Management of bleeding in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia (EACH2) Registry. *Blood*. 2012;120(1):39–46. doi: 10.1182/blood-2012-02-408930.

6. Tiede A, Hofbauer CJ, Werwitzke S, et al. Anti-factor VIII IgA as a potential marker of poor prognosis in acquired hemophilia A: results from the GTH-AH 01/2010 study. *Blood*. 2016;127(19):2289–2297. doi: 10.1182/blood-2015-09-672774.

7. Kruse-Jarres R, Kempton CL, Baudo F, et al. Acquired hemophilia A: Updated review of evidence and treatment guidance. *Am J Hematol*. 2017;92(7):695–705. doi: 10.1002/ajh.24777.

8. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost*. 1995;73(2):247–251.

9. Napolitano M, Siragusa S, Mancuso S, Kessler CM. Acquired haemophilia in cancer: A systematic and critical literature review. *Haemophilia*. 2018;24(1):43–56. doi: 10.1111/hae.13355.

10. Tiede A, Klamroth R, Scharf RE, et al. Prognostic factors for remission of and survival in acquired hemophilia A (AHA): results from the GTH-AH 01/2010 study. *Blood*. 2015;125(7):1091–1097. doi: 10.1182/blood-2014-07-587089.

# Léčba nově diagnostikovaného mnohočetného myelomu v roce 2021

Maisnar V.

4. interní hematologické klinika LF UK a FN Hradec Králové

Mnohočetný myelom (MM) je lymfoproliferativní onemocnění charakterizované klonální proliferací a akumulací nádorově transformovaných plazmatických buněk v kostní dřeni provázené útlakem normální krvetvorby, osteolytickým postižením skeletu a ve většině případů přítomností monoklonálního imunoglobulinu v séru a/nebo v moči. Pro stanovení diagnózy MM je tak dnes zcela nezbytný průkaz přítomnosti klonální populace plazmatických buněk v kostní dřeni. Klonalita by měla být stanovena pomocí průkazu  $\kappa/\lambda$  restrikce lehkých řetězců při vyšetření pomocí průtokové cytometrie, imunohistochemie nebo imunofluorescence, počet plazmatických buněk by měl být přednostně stanoven z biopsie kostní dřene; v případě rozdílu v procentuálním zastoupení plazmatických buněk zjištěném v aspirátu a biopstickém vzorku by měla být použita vyšší hodnota [1].

Z hlediska diferenciální diagnostiky a indikace k zahájení léčby mnohočetného myelomu (MM) je dle aktuálních IMWG doporučení nezbytné odlišit monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS), doutnajícím formu MM a mnohočetný myelom jako takový (dříve symptomatický MM). Tyto jed-

notky je nezbytné při diagnóze nové monoklonální gamapatie od sebe pečlivě odlišit, protože pouze MM zatím představuje jednoznačně stav, u kterého je nutné bezprostřední zahájení léčby [1].

Léčba mnohočetného myelomu by měla být zahájena v případě splnění kritérií symptomatické fáze onemocnění, kterými jsou známky orgánového poškození označované „CRAB“ nebo u vysoce rizikových asymptomatických nemocných, u kterých je riziko časné progresy do aktivního onemocnění vyžadujícího léčbu vyšší než 80 % (což v současnosti splňuje přítomnost kteréhokoli z tzv. „biomarkerů malignity“, tab. 1).

U nově diagnostikovaných nemocných s MM do 70 let věku dnešní léčebné strategie používají vždy, pokud je to možné, maximální možnou intenzivní léčbu s potenciálem dosažení MRD negativity, tj. úplného vymýcení klonální nádorové populace v kostní dřeni. Ta zahrnuje vstupní indukční fázi (2–6 cyklů kombinované léčby – režim s bortezomibem a/nebo lenalidomidem nebo thalidomidem a dexamethasonem), myeloablativní léčbu (1–2 autologní transplantace – obvykle po melfalanu

200 mg/m<sup>2</sup>) a udržovací léčbu (lenalidomid 10 mg). Fakultativně lze použít konsolidační léčbu (3–4 cykly kombinované léčby jiné než ve vstupní části indukce), zde je však nezbytné předchozí schválení zdravotní pojišťovny. Jako konsolidace u nemocných s cílem dosáhnout maximální léčebné odpovědi a dlouhodobého trvání remise může být použita i opakovaná (tandemová) autologní transplantace. Tato je rovněž doporučena u nemocných s přítomností „high risk“ cytogenetických změn.

Podobný postup jako u mladších nemocných, ale bez provedení autologní transplantace, by měl být zvažován i u seniorů starších 70 let, léčba bývá však méně intenzivní a více modifikovaná s ohledem na stav nemocného. Základním doporučeným režimem se zde stal režim bortezomib-lenalidomid-dexamethason, jehož použití dnes preferujeme před ostatními možnostmi léčby [2]. U pacientů starších 70 let v dobrém celkovém stavu lze podobně jako u mladších nemocných využít i melfalanu v dávce redukované na 100 mg/m<sup>2</sup> podané dvakrát krátce po sobě po předchozím podání 4–6 cyklů indukčního režimu.

**Tab. 1. Kritéria poškození orgánů či tkání myelomem a biomarkery maligního procesu [1].**

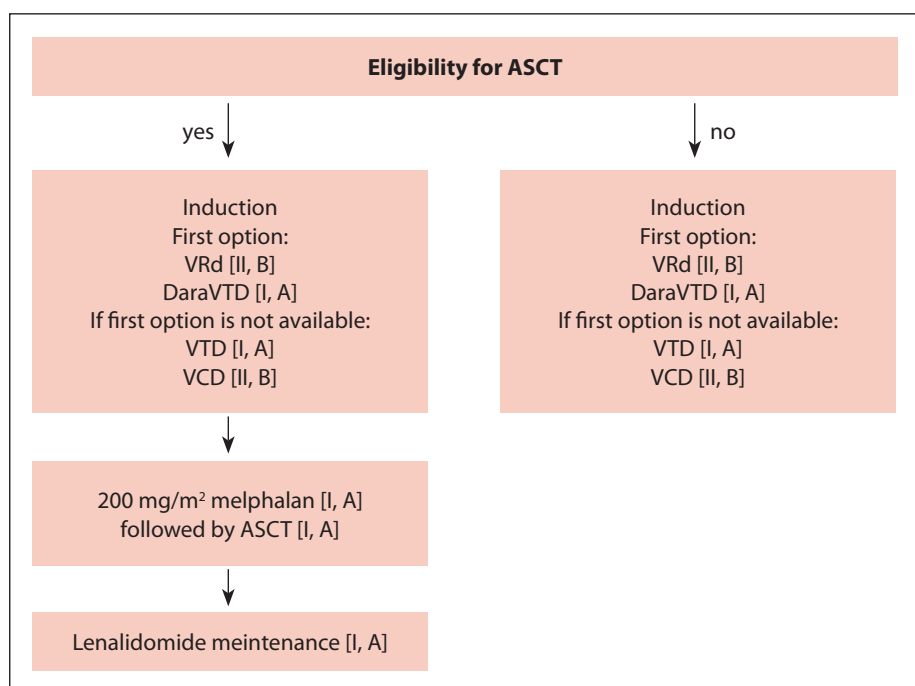
Kritéria poškození orgánů či tkání myelomem:

- C – hyperkalcemie: koncentrace sérového Ca o > 0,25 mmol/l (1 mg/dl) vyšší než horní limit normálního rozmezí nebo > 2,75 mmol/l (11 mg/dl)
- R – renální insuficience: snížení clearance kreatininu < 40 ml/min (= 0,67 ml/s) nebo koncentrace sérového kreatininu 177  $\mu$ mol/l (2 mg/dl)
- A – anémie: koncentrace hemoglobinu o > 20 g/l nižší než dolní limit norm. rozmezí nebo > 100 g/l
- B – kostní postižení: jedno nebo více osteolytických ložisek na RTG skeletu, CT nebo CT/PET

Biomarkery maligního procesu:

- zmnožení klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni  $\geq$  60 %
- poměr postižených/nepostižených volných lehkých řetězců v séru  $\geq$  100 (metoda Freelite®)
- > 1 ložisko o velikosti minimálně 5 mm při vyšetření pomocí MR





**Graf 1. Vývoj vybraných laboratorních parametrů v čase – období 2014–2019.**

U všech nově diagnostikovaných pacientů s MM se zásadním přínosem nově zdá přidání antiCD38 monoklonální protilátky, třebaže je její použití v současnosti vyhrazeno především pro relabované onemocnění. Nejnadějnějšími režimy do budoucna se dnes dle zatím předběžných výsledků zdají kombinace daratumumabu-karfilzomibu-lenalidomidu-dexamethasonu resp. daratumumabu-bortezomibu-lenalidomidu-dexamethasonu, kterými se při použití v rámci primoterapie podařilo dosáhnout MRD negativity až u 70 % nemocných. Obecný léčebný algoritmus EHA-ESMO, ze kterých vychází i současné léčebné doporučení České myelomové skupiny, zobrazuje schéma 1.

U nově diagnostikovaných nemocných s mnohočetným myelomem je kromě kauzální léčby nezbytné použití i léčby podpůrné. U všech pacientů je indikováno použití bisfosfonátů nebo

denosumumabu v rámci prevence projevů kostního poškození. Erythropoetin je indikován k léčbě anémie u pacientů s mnohočetným myelomem a renálním selháním, respektive u všech pacientů s anémií pod 100 g/l. U režimů s vysokodávkovanými kortikoidy je indikováno podávání cotrimoxazolu v rámci prevence pneumocystové pneumonie, u režimů s inhibitory proteasomu a s lenalidomidem je indikována antivirová profylaxe (acyklovir, valacyclovir), profylaktické podávání antibiotik ani antimykotik není rutinně doporučeno. Je indikována profylaxe trombotických komplikací, a to zejména u režimů obsahujících IMiDy. Samozřejmě je léčba bolesti moderními léčebnými přípravky s využitím různých stabilizačních postupů, v případě splnění příslušných indikací je indikováno použití dialýzy event. plazmaferézy.

V roce 2021 lze tedy říct, že za příznivých prognostických podmínek při

stanovení diagnózy a při použití komplexní intenzivní vstupní léčby včetně udržovací léčby může být mnohočetný myelom vyléčitelný [3]. U většiny nemocných se však po léčbě vstupní fáze onemocnění aktivita nemoci znovu vrací a dochází k opakujícím se relapsům/progresím. Mnohočetný myelom v relapsu či progresi pak již není stávajícími léčebnými možnostmi vyléčitelný, avšak s využitím nových vysoce účinných léků se prognóza stále zlepšuje. Asi 40 % nemocných podstupujících intenzivní léčbu dnes žije déle než 10 let od stanovení diagnózy [4]. Zcela zásadní tak z pohledu nemocného s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem je volba léčby použité v rámci primoterapie. Jejím cílem by mělo být dosažení maximální léčebné odpovědi, kdy usilujeme o tzv. imunofenotypovou remisi spojenou s vymizením klonální nádorové populace v kostní dřeni, která je dnes již u části případů MM spojena s dlouhodobou remisí onemocnění, resp. trvalým vyléčením [5].

## Literatura

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15:e538–e548.
2. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *HemaSphere.* 2021;5:1–12.
3. Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, et al. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood* 2014;124:3043–3051.
4. Hájek R, Maisnar V, Krejčí M, et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transf. Hematol.* Dnes. 2018;Supl.1:1–155.
5. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016;17:e328–e346.

## Léčba mnohočetného myelomu v relapsu

Minařík J.

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Přestože je mnohočetný myelom (MM) stále lépe léčitelný, u většiny nemocných dochází v následném průběhu po vstupní léčbě k opětovnému návratu onemocnění. Dříve byly možnosti léčby v relapsu omezené s obvykle zkracujícími se intervaly doby bez progresu (*progression free survival* – PFS).

V poslední dekádě došlo k zásadní proměně léčby relabovaného a/nebo refrakterního mnohočetného myelomu (R/R MM) díky kombinacím nových léků s biologickým mechanismem účinku. Nové strategie a léčebné možnosti zásadním způsobem zvýšily účinnost léčby a vedly k významnému prodloužení celkového přežití. Nezřídka i v relapsu můžeme dosáhnout lepších léčebných výsledků s delším intervalem PFS než v léčbě první linie.

Pro léčbu R/R MM můžeme v současnosti použít sedm různých tříd schválených léků: alkylační látky, kortikosteroidy, inhibitory proteasomu (PI), imunomodulační léky (IMiD), inhibitory histonové deacetylázy, monoklonální protilátky (MoAb) a selektivní inhibitory jaderného exportu (SINE) (tab. 1).

K těmto možnostem se ještě přidávají kombinované chemoterapeutické režimy, přičemž u všech léčebných modalit je u vhodných kandidátů na zvážení provedení autologní transplantace krvetvorných buněk (ASCT).

Před vlastní léčbou relapsu je nejprve nutná řádná definice stavu onemocnění a splnění potřebných indikačních kritérií:

Za progresi/relaps považujeme stav onemocnění, u nějž zachytíme alespoň jednu z následujících možností:

- 1) vzestup M-proteinu  $\geq 25\%$  (od nižší hodnoty) A SOUČASNĚ alespoň jedna z následných hodnot:
  - nárůst M-proteinu v séru  $\geq 5$  g/l,
  - nárůst M-proteinu v moči  $\geq 200$  mg / 24 h,
  - nárůst rozdílu volných lehkých řetězců séra (FLC)  $\geq 100$  mg/l;
- 2) vzestup infiltrace KD  $\geq 10\%$ ;
- 3) nové kostní/extramedulární léze.

Dříve se ještě odlišoval relaps jako stav, kdy došlo ke zhoršení zmíněných ukazatelů z předchozí kompletní remise, oproti progresi, která znamenala nárůst ukazatelů myelomu bez předešlého do-

sažení kompletní remise. V současnosti jsou oba pojmy zaměnitelné, v nových kritériích je ale zmíněn pojem „relaps z kompletní remise“, který značí:

- 1) opětovnou přítomnost M-proteinu v imunofixaci séra a/nebo moči (po předchozí negativitě) NEBO
- 2) záchyt  $\geq 5\%$  klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni.

Z důvodu indikačních kritérií některých léků je ještě nutné zmínit pojem relabovaný a refrakterní myelom (RRMM), který (na rozdíl od pouze relabovaného onemocnění) značí stav, kdy došlo k relapsu na léčbě nebo do 60 dnů od ukončení léčby, jež předtím vedla k alespoň minimální léčebné odezvě (MR). Pro úplnost doplňujeme pojem primárně refrakterní myelom, u nějž v žádné předešlé linii nebylo dosaženo ani MR.

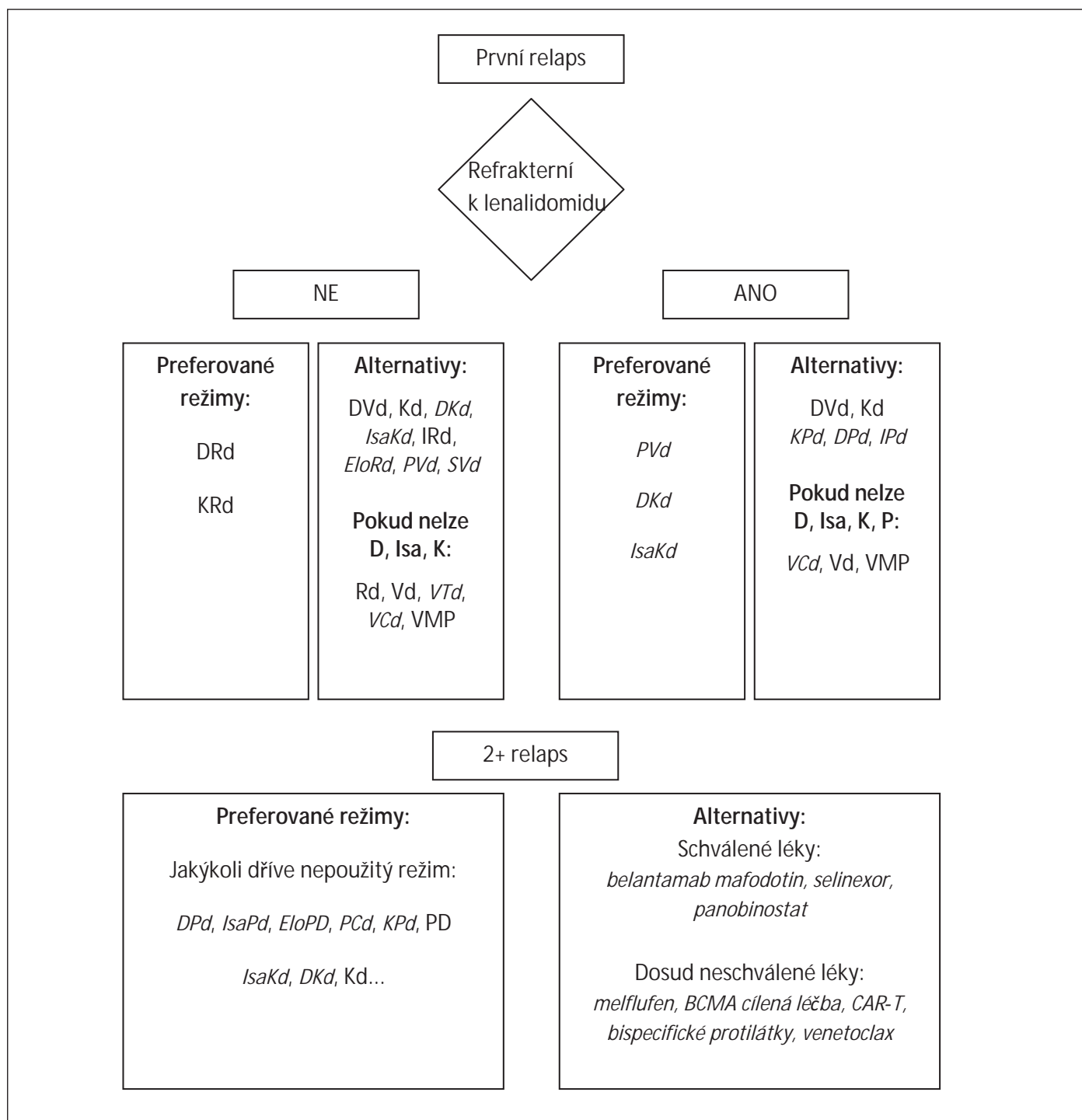
Indikací k léčbě pak může být pouhé splnění kritérií progresu/relapsu (obvyklé v klinických studiích), jednoznačnou indikací je tzv. klinický relaps, tedy rozvoj příznaků onemocnění (CRAB) bez ohledu na splnění kritéria laboratorního relapsu. U asymptomatických průběhů

**Tab. 1. Schválené léky v léčbě mnohočetného myelomu.**

Základní „biologické“ léky	Inhibitory proteasomu (PI)	bortezomib	carfilzomib	ixazomib
	Imunomodulační látky (IMiDs)	thalidomid	lenalidomid	pomalidomid
	Monoklonální protilátky (MoAb)	elotuzumab	daratumumab	isatuximab
Konvenční chemoterapie	Alkylační látky	melfalan	cyklofosfamid	bendamustin
	Kortikosteroidy	dexametazon	prednison	metylprednisolon
	Jiné*	antracykliny, vinca alkaloidy, platinové deriváty, ...		
Malé molekuly**	Inhibitory histonové deacetylázy (HDAC)	panobinostat		
	Inhibitory jaderného transportu (SINE)	selinexor		

\*méně často užívané, spíše v rámci specifických situací (antracyklinové režimy – u renální insuficience či extramedulární nemoci, polychemoterapeutické kombinace – agresivní onemocnění s periferní leukemizací, apod.)

\*\* řada dalších molekul je ve vývoji či ve fázi před schválením indikace



**Schéma 1. Vývoj vybraných laboratorních parametrů v čase – období 2014–2019.**

se obvykle doporučuje zahájení léčby při zdvojovacím čase M-proteinu 2 měsíce (a současně hladině M-proteinu v séru minimálně 10g/l nebo v moči 500 mg / 24 hod).

Přestože jsou možnosti léčby relapsu poměrně široké, klíčovou molekulou je v současné době lenalidomid (LEN). Pro nemocné, kteří nejsou LEN refrakterní, je ve většině případů indi-

kována terapie lenalidomid, dexametazon (Rd) spolu s třetím novým preparátem. Řada klinických hodnocení fáze III prokázala účinnost kombinovaných režimů. Zejména trojkombinace daratumumab, lenalidomid a dexametazon (DRd) zaznamenala mimořádný léčebný účinek s vysokým procentem kompletních remisí (CR – 56,6 %) vč. negativitu zbytkové choroby (MRD – 30,4 %) s vý-

znamným prodloužením mediánu PFS na 44,5 měsíců, proto je v současnosti upřednostňována u většiny relabujících pacientů.

Také další kombinované režimy s lenalidomidem prokázaly výbornou účinnost a signifikantní prodloužení doby do progresu, případně i celkového přežití oproti dvojkombinaci RD, například kombinace s karfilzomibem (KRd), ixazomibem (IRd),

elotuzumabem (EloRd) či bortezomibem (VRd). Výběr režimu závisí od řady přidružených ukazatelů (především léčba a její efekt, cytogenetické riziko, forma aplikace léčby, komorbidita a preference nemocného a další), ve většině případů je ale v současnosti volba zastíněna účinností režimu DRd, byť vzájemně byly jednotlivé režimy porovnávány jen nepřímo.

U nemocných refrakterních či jinak nevhodných pro léčbu LEN je zatím volba terapeutického postupu výzvou. Postupně se rozšiřuje spektrum režimů založených na inhibitech proteasomu (bortezomib a karfilzomib), případně kombinace s dalším IMiDem, pomalidomidem. Zásadní posun v léčbě přinesly zejména monoklonální protilátky (daratumumab, isatuximab, elotuzumab), které lze účinně kombinovat s většinou používaných tříd. S posunem těch nejúčinnějších kombinací do předních linií se stává hlavní otázkou léčba třetí a vyšší linie, kdy lze předpokládat refrakteritu na tři hlavní třídy, tj. na minimálně jeden lék ze skupiny PI, IMiDů i MoAb. Současný doporučovaný algoritmus pro léčbu relabovaného MM je uveden v rámci schéma 1.

Další lékové skupiny patří mezi tzv. „malé molekuly“, které zlepšují účinek dosavadních dvojkombinačních režimů, obvykle ale jen zřídka přesahují medián PFS 20 měsíců, jako je tomu např. v kombinaci inhibitoru bcl-2 venetoclaxu s bortezomibem a dexametazonem u nemocných s prokázanou t(11;14) či zvýšenou expresí bcl-2.

U mnohočetného myelomu zatím neexistuje „cílená léčba“ v pravém slova smyslu. Přesto jsou v určitých případech preferovány konkrétní režimy. Pacienti s přítomností t(4;14) by měli být preferenčně léčeni PI, nemocní s t(11;14) zase obvykle dobře odpovídají na léčbu IMiDy či venetoclaxem. V případě rizikové cytogenetiky – kromě t(4;14) navíc ještě t(14;16), del17p a amplifikace 1. chromozomu jsou vhodné kombinované režimy PI a IMiDů.

Obecně jsou u všech nemocných doporučované trojkombinace léků, které mají vyšší účinnost. Pro křehké seniory však často bývá léčba příliš toxická, proto může být dostatečný i dvojkombinační režim.

V pozdějších fázích léčby již obvykle není cílem dosažení kompletní remise

či lepší odezvy, ale udržení stability onemocnění a dobré kvality života. Obvykle je cílem podat léky, které dosud nebyly v léčbě použity, případně v nových kombinačních režimech dle individuálního stavu a tolerance nemocného. Dle možností je vhodné využít nabídky klinických hodnocení, případně nově schvalovaných léků.

Lze předpokládat, že s příchodem dalších nových léčebných možností (zejména imunoterapie) bude možné opět posunout hranice léčby i u RRMM.

## Literatura

1. Hájek R, et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu 2018. *Transfuzie Hematol Dnes*. 2018; suplement 1.
2. Hájek R, Maisnar V, Minařík J, et al. Mnohočetný myelom. In: Doubek M, Mayer J.: *Léčebné postupy v hematologii 2020*, Česká hematologická společnost ČLS JEP, 2020; ISBN 978-80-270-82407.
3. Moreau P, Kumar SK, San Miguel J, et al. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: recommendations from the International Myeloma Working Group.
4. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 2014;15:e538–e548.

## „Unmet medical need“ – léčba nemocných refrakterních na lenalidomid

Hájek R.

*Klinika hematologie LF OU a FN Ostrava*

**Souhrn:** Léčebné možnosti pro pacienty s mnohočetným myelomem se v posledních letech významně rozšiřují. Léčba nemocných refrakterních na lenalidomid zůstává pro hematology výzvou. Dostupné léčebné kombinace jsou účinné a výstupy randomizovaných klinických studií jsou jednoznačně pozitivní. Klinický přínos nicméně nelze označit za zásadní pokrok. Medián doby do další progresy onemocnění u režimů využívající další imunomodulační látku zpravidla není delší než 1 rok, časnější použití významně zlepšuje výsledky. Příslibem jsou režimy bez použití imunomodulační látky a rovněž nové pokroky v imunoterapii. Zde výstupy klinických studií ještě nejsou u většiny testovaných léčebných modalit známy, neboť byly nejprve testovány u nemocných s pokročilým onemocněním.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom – refrakterní – lenalidomid – klinické studie

### ÚVOD

Mnohočetný myelom (MM) tvoří 1 % všech nádorových onemocnění a při-

bližně 10 % hematologických krevních nádorových onemocnění. V léčbě MM bylo v poslední dekádě dosaženo znač-

ného pokroku díky zavedení nových léčiv do léčebné strategie nově diagnostikované nemoci i relapsu, což vede

k významnému zlepšení celkového přežití nemocných [1].

V posledních letech bylo schváleno několik nových léků – inhibitor histonové deacetylázy panobinostat, inhibitor jaderného exportu selinexor, monoklonální protilátky daratumumab, elotuzumab a isatuximab a konjugát monoklonální protilátky s cytostatikem – belantamab mafodotin, které byly začleněny do klinických guidelineů a významně změnilo postup v léčbě MM. V současné době lze ze sedmi lékových skupin (alkylační látky, kortikoidy, proteasomové inhibitory, imunomodulační léky, inhibitory histonové deacetylázy, inhibitory jaderného exportu a monoklonální protilátky) vytvářet účinné dvojkombinace až čtyřkombinace, které s doplněním autologní transplantace kmenových buněk nebo bez ní umožňují volit optimální léčebnou strategii pro nemocné s nově diagnostikovaným MM i refrakterním/relabujícím MM [2,3].

Jedním z klíčových faktorů pro úspěšnost léčby v časných relapsech onemocnění je refrakterita na lenalidomid, který se v současnosti používá jak u nové diagnózy, tak v léčbě relapsu onemocnění.

Spolu se skupinou nemocných s „high-risk“ myelomem u nové diagnózy a skupinou triple/penta-refrakterních nemocných jde o tři podskupiny nemocných, které se často označují „unmet medical need“. Pro tyto nemocné doposud nemáme významně účinné režimy. Je vhodné zdůraznit, že v současnosti se začíná postupně stírat rozdíl mezi nemocnými refrakterními na lenalidomidem a tzv. „triple-refractory“ nemocnými, neboť se více a více používají triplety s lenalidomidem.

Předložené doporučené postupy u nemocných refrakterních na lenalidomidem vychází z guidelineů Mezinárodní myelomové pracovní skupiny (IMWG) [4] a Evropské společnosti pro hematologii (EHA) a klinickou onkologii (ESMO) [3,5] založených na recentních výsledcích klinických studií. Některé léčebné kombinace ještě nejsou v ČR dostupné.

## REFRAKTERITA NA LENALIDOMID

Obecně platí, že onemocnění není citlivé na podanou léčbu, pokud nedosáhne aspoň minimální léčebné odpovědi v průběhu léčby nebo pokud onemocnění progreduje do 60 dnů po ukončení léčby [6]. Diskuzi u lenalidomidu zasluží stav, kdy nemocný užívá lenalidomid v dávce 10 mg denně jako udržovací léčbu po provedení autologní transplantace. Řada expertů zastává názor, že pokud je v takovém případě vzestup paraproteinu pozvolný, nemusí jít o rezistenci na lenalidomid a prosté navýšení dávky lenalidomidu na 25 mg a přidání dalších léků může mít dobrý efekt. Tuto situaci neřeší upřesněním ani mezinárodní a evropská doporučení z roku 2021. Přesto se lze domnívat, že základní definice uvedená výše je nepřekročitelná a platí i v případě udržovací léčby s využitím nízké dávky lenalidomidu. Na druhou stranu to neznamená, že by nemocný nemohl být léčen tripletem s plnou dávkou 25 mg lenalidomidu s dílčím úspěchem, zvláště pokud není k dispozici jiná léčba. V ČR však máme dostupné jiné kombinace, tedy obecně je vhodnější rotace léků s různým mechanismem účinku či aspoň použití léku jiného, třebaže ze stejné skupiny (např. pomalidomid po lenalidomidu).

## LÉČBA RELAPSU U PACIENTŮ S ONEMOCNĚNÍM REFRAKTERNÍM K LÉČBĚ LENALIDOMIDEM

U pacientů, jejichž onemocnění progreduje po léčbě lenalidomidem, byla standardním postupem léčba kombinací pomalidomid-dexametazon (PD). Doporučení vycházelo z pozitivních výsledků studie fáze III MM-003, ve které byla účinnost u nemocných refrakterních na lenalidomidem limitovaná [7]. Pro první volbu jsou doporučeny režimy hodnocené v klinických studiích fáze III, provedené u pacientů s RRMM po alespoň jedné linii léčby vč. nemocných, jejichž onemocnění bylo refrakterní k lenalidomidu. Léčebné režimy lze rozdělit

na ty, ve kterých je základem pomalidomid s dexametazonem (PD) a režimy bez imunomodulační látky.

Kombinace PD byla použita jako kontrolní soubor v randomizovaných studiích zaměřených právě na nemocné refrakterní na lenalidomid přidávající k PD další lék. Ve všech případech režimy potvrdily proti srovnávanému režimu statisticky signifikantní prodloužení PFS:

- 1) pomalidomid-bortezomib-dexametazon (P-Vd) vs Vd ve studii OPTIMISMM (11,2 vs 7,1 měsíce; HR 0,61;  $p < 0,0001$ ) [8];
- 2) přidání monoklonální protilátky isatuximabu (Isa-Pd) ve studii ICARIA s prodloužením PFS (medián) z 6,5 na 11,5 měsíce (HR 0,596;  $p = 0,001$ ) [9];
- 3) přidání monoklonální protilátky daratumumabu (Dara-Pd) ve studii APOLLO s prodloužením PFS (medián) z 6,9 na 12,4 měsíce (HR 0,63;  $p = 0,0018$ ) [10];
- 4) přidání monoklonální protilátky elotuzumabu (Elo-Pd) ve studii ELOQUENT-3 (randomizovaná fáze II) s prodloužením PFS (medián) z 4,7 měsíce na 10,3 měsíce (HR 0,54;  $p = 0,008$ ) [11].

U všech studií byl prokázán i přínos pro podskupiny nemocných refrakterních na lenalidomid, které tvořily vždy nejvýznamnější část souboru nemocných v rozpětí od 71–94 %. Účinnost jiných režimů, jako karfilzomib-pomalidomid-dexametazon (KPd) [12] a ixazomib-pomalidomid-dexametazon (Ixa-Pd) [13], vychází doposud z dat klinických studií fáze II.

Je pravděpodobné, že režimy bez imunomodulační látky budou u nemocných refrakterních na lenalidomidem účinnější. Výsledky jsou velmi dobré. Limitací však je, že na rozdíl od klinických studií s pomalidomidem nebyly tyto studie cíleny na nemocné refrakterní na lenalidomid, kterých je v souboru nemocných jen jedna třetina (platí pro studie CANDOR a IKEMA). Triplety vždy potvrdily proti srovnávanému režimu statisticky signifikantní prodloužení mediánu PFS:

**Tab. 1. Léčba prvního relapsu MM u pacientů s onemocněním refrakterním k léčbě lenalidomidem.**

Preferované režimy (založené na výsledcích klinických studií fáze III)	P-Vd, Dara-Pd, Isa-Pd, Dara-Kd, Isa-Kd, Elo-Pd (fáze II)
Režimy druhé volby (založené na výsledcích klinických studií fáze III)	Dara-Vd, KD,
Další léčebné možnosti (založené na výsledcích klinických studií fáze II)	K-Pd, Ixa-Pd,
Při nedostupnosti daratumumabu, karfilzomibu	PD, CVD, VD, VMP

C – cyklofosfamid, D/d – dexametazon, Dara – daratumumab, Elo – elotuzumab, Isa – isatuximab, Ixa – ixazomib, K – karfilzomib, M – melfalan, P – prednison, P – pomalidomid, V – bortezomib

**Tab. 2. Přehled výstupů klinických studií.**

Studie	CANDOR (fáze III)	IKEMA (fáze III)	APOLLO (fáze III)	ICARIA (fáze III)	OPTIMISMM (fáze III)	ELOQUENT-3 (fáze II)
Kombinace	Dara-Kd	Isa-Kd	Dara-Pd	Isa-Pd	V-Pd	Elo-Pd
Indikace: LOT	1–3	1–3	≥ 1 line	≥ 2 line	1–3 line	≥ 2 line
Medián předchozích LOT	2 (1–4)	2 (1–5)	2 (1–5)	3 (2–11)	2 (1–2)	3 (2–8)
Lenalidomid refrakterní (%)	32%	32%	79%	94%	71%	90%
Medián PFS (měsíce)	28,6 m (KR 15,8 m) HR 0,59 (95% CI 0,45–0,78)	NR (KR 19,2 m) HR 0,531 (99% CI 0,318–0,889)	12,4 m (KR 6,9 m) HR 0,63 (95% CI 0,47–0,85)	11,5 m (KA 6,5 m) HR 0,596 (95% CI 0,44–0,81)	11,2 m (KA 7,1 m) HR 0,61 (95% CI 0,49–0,77)	10,3 m (KA 4,7 m) HR 0,54 (95% CI 0,34–0,86)
MRD negativita	22,80%	29,60%	9%	5,20%		

C – cyklofosfamid, D/d – dexametazon, Dara – daratumumab, Elo – elotuzumab, Isa – isatuximab, Ixa – ixazomib, K – karfilzomib, M – melfalan, P – prednison, P – pomalidomid, V – bortezomib, LOT – počet léčebných linií, KR – kontrolní rameno, MRD – minimální zbytkové onemocnění (minimal residual disease)

- 1) daratumumab-karfilzomib-dexametazon (Dara-Kd) vs karfilzomib-dexametazon (KD) ve studii CANDOR (28,6 vs 15,8 měsíce; HR 0,59;  $p < 0,0027$ ). Dara-Kd bylo lepší i ve skupině na lenalidomid refrakterních nemocných (HR 0,45) [14,15];
- 2) isatuximab-karfilzomib-dexametazon (Isa-KD) ve studii IKEMA (medián nedosažen vs 19,15 měsíce pro KD; HR 0,53;  $p = 0,0007$ ) [4]. Tyto režimy doposud v ČR nemají úhradu.

Jiné možnosti již dostupné v ČR, s kontrolním ramenem bortezomib-dexametazon (VD), jsou kombinace:

- 1) daratumumab-bortezomib-dexametazon (Dara-Vd) ve studii CASTOR (medián PFS 16,7 vs 7,1 měsíce;  $p < 0,0001$ ) [16];
- 2) karfilzomib-dexametazon (KD) ve studii ENDEAVOR (medián PFS 18,7 vs 9,4 měsíce;  $p < 0,0001$ ) [17].

U těchto studií nejsou známá data o účinnosti u lenalidomid refrakterních nemocných z důvodu malého zastoupení v souboru. Podobně platí pro třetí studii, kombinaci venetoclax-bortezomib-dexametazon (Ven-Vd), která ještě není v EU registrovaná, ale nabízí velmi účinnou možnost pro nemocné s t(11;14) a vysokou expresí bcl-2 [18]. Aktuálně probíhá zkoušení venetoclaxu v kombinaci s dexametazonem vs PD u pacientů s RRMM s t(11;14), refrakterních k lenalidomidu v klinické studii fáze III CANOVA.

Následné analýzy z výše uvedených klinických studií ukázaly na obecný jev, tj. skutečnost, že časnější použití tripletů v prvním relapsu znamená vždy významnější přínos pro nemocného, měřeno mediánem doby do progresu (ilustrativně pro režim P-Vd medián PFS v prvním relapsu 20,7 měsíce vs. medián

PFS ve studii 11,2 měsíce) [19]. Pro doporučené režimy pro léčbu prvního relapsu MM u pacientů s onemocněním refrakterním k léčbě lenalidomidem uvádí tab. 1. Další cenné údaje o provedených klinických studiích s ohledem na předchozí léčbu, refrakteritu k lenalidomidu jsou obsaženy v tab. 2.

## AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE V RELAPSU MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Autologní transplantaci lze provést v relapsu po ASCT v první linii léčby. Nejdůležitějším prognostickým faktorem pro PFS po ASCT u prvního relapsu je délka remise po ASCT v první linii léčby. K využití autologní transplantace v relapsu onemocnění nejsou doposud dostupná zásadní data upřesňující pozici konsolidace léčebné odpovědi dosažené pomocí moderního tripletu. Taková data

nejsou známa ani u nemocných refrakterních na lenalidomid. Přesto je re-transplantace jednou z léčebných účinných modalit. V případě, že je léčebná odpověď na vybraný léčebný režim u nemocného refrakterního na lenalidomid neuspokojivá, lze tuto léčebnou možnost jistě zvážit a medicínsky obhájit.

## ZÁVĚR

Léčebné možnosti pro pacienty s nově diagnostikovaným i relabujícím/refrakterním mnohočetným myelomem se v posledních letech díky zavedení řady nových léčiv významně zlepšují. Skupina nemocných refrakterních na režimy s lenalidomidem se stále více přibližuje skupině nemocných tzv. „triple“-refrakterních, neboť lenalidomid je používán stále více v tripletech také u nové diagnózy.

Režimy bez jiné imunomodulační látky se zdají být nejúčinnější variantou pro nemocné refrakterní na lenalidomid. Dalším klinicky významným pokrokem bude pravděpodobně zavedení nových imunoterapeutických léčebných strategií.

## Grantová podpora

Práce byla podpořena MZ ČR – RVO-FNOs/2020.

## Literatura

1. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. ESMO Guidelines Committee. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; 28(suppl 4):iv52–iv61.
2. Moreau P, Dimopoulos M, Mikhael J, et al. Isatuximab plus carfilzomib and dexamethasone vs carfilzomib and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma (IKEMA):

a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* 2021; online ahead of print.

3. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Hemasphere* 2021;5(2):e528.
4. Moreau P, Kumar SK, San Miguel J, et al. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: recommendations from the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol* 2021;22(3):e105–e118.
5. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2021;32(3):309–322.
6. Hájek R, Maisnar V, Krejčí M, et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transfuzie Hematol Dnes*. 2018;(Supl.1):1–155.
7. San Miguel J, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):1055–1066.
8. Richardson PG, Oriol A, Beksac M, et al. Pomalidomide, bortezomib, and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma previously treated with lenalidomide (OPTIMISMM): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20:781–794.
9. Attal M, Richardson PG, Rajkumar SV, et al. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019;394:2096–2107.
10. Dimopoulos MA, Terpos E, Boccadoro M, et al. APOLLO Trial Investigators. *Lancet Oncol*. 2021;22(6):801–812.
11. Dimopoulos MA, Dytfield D, Grosicki S et al. Elotuzumab plus pomalidomide and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2018;379:1811–1822.
12. Sonneveld P, Zweegman S, Cavo M, et al. Carfilzomib, pomalidomide and dexamethasone (KpD) in patients with multiple myeloma

refractory to bortezomib and lenalidomide. the EMN011 trial. *Blood* 2018;801–801.

13. Krishnan A, Kapoor P, Palmer JM, et al. Phase I/II trial of the oral regimen ixazomib, pomalidomide, and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leukemia* 2017;18. doi: 10.1038/leu.2017.352.
14. Dimopoulos M, Quach H, Mateos MV, et al. Carfilzomib, dexamethasone, and daratumumab versus carfilzomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CANDOR): results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2020; 396(10245):186–197.
15. Dimopoulos M, Quach H, Mateos M-V, et al. Carfilzomib, dexamethasone, and daratumumab versus carfilzomib and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated efficacy and safety results of the Phase 3 Candor Study. *ASH Annual Meeting and Exposition 2020*; abstr.2325.
16. Mateos M-V, Sonneveld P, Hungria V, et al. Daratumumab, bortezomib, and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone in patients with previously treated multiple myeloma: three-year follow-up of CASTOR. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 2020;20(8):509–518.
17. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A, et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open label, multicentre study. *Lancet Oncol* 2016;17:27–38.
18. Harrison S, Cavo M, De La Rubia J, et al. T(11;14) and high BCL2 expression are predictive biomarkers of response to venetoclax in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: Biomarker analyses from the phase 3 Bellini study. *Blood* 2019;134–142.
19. Dimopoulos M, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide, bortezomib, and dexamethasone for multiple myeloma previously treated with lenalidomide (OPTIMISMM): outcomes by prior treatment at first relapse. *Leukemia*. 2021;35(6):1722–1731.

# Imunoterapie – nejperspektivnější léčebná modalita současnosti u mnohočetného myelomu

Jelínek T.

LF OU a FN Ostrava

Imunitní systém hraje zásadní roli v boji proti rakovině a imunoterapie se stala nedílnou a mnohdy zlomovou součástí

léčby jak solidních, tak hematologických nádorů. Cílem imunoterapie je aktivovat a pobídnout vlastní imunitní systém pa-

cienta k tomu, aby rozeznal a eliminoval nádorové buňky. Alogenní transplantace má kurativní potenciál u mnoha

krevních nádorů a je jedním ze základních příkladů imunoterapie. Imunoterapie může být logicky rozdělena do několika kategorií:

- 1) monoklonální protilátky (mAbs) zahrnující celou řadu tříd s různými mechanismy účinku;
- 2) buněčná terapie reprezentovaná především moderními CAR (chimeric antigen receptor) technologiemi, ať už ve formě CAR-T buněk nebo CAR-NK buněk a pro úplnost;
- 3) protinádorové vakcíny.

## MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY (MABS)

Imunoglobulin G (IgG) protilátky jsou velké molekuly s molekulární hmotností okolo 150 kDa, které se skládají z těžkého (≈50 kDa) a lehkého (≈25 kDa) polypeptidového řetězce. Každá molekula imunoglobulinu se skládá z 2 částí Fab (fragment-antigen binding) fragment a Fc (fragment constant) fragment, ke kterému se vážou efektorové buňky imunitního systému pomocí svého Fc receptoru. Protilátky hrají klíčovou roli v rámci specifické imunitní odpovědi a díky technologickému pokroku je nyní možno vyrábět monoklonální protilátky proti specifickým antigenům exprimovaným na povrchu nádorových buněk, které nás dostávají do éry tzv. cílené imunoterapie. Monoklonální protilátky zabíjí nádorové buňky pomocí několika mechanismů účinku:

- 1) ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) – protilátkou zprostředkovaná buněčná cytotoxicita;
- 2) CDC (complement dependent cytotoxicity) – komplementem zprostředkovaná cytotoxicita;
- 3) ADCP (antibody dependent cellular phagocytosis) – protilátkou aktivovaná fagocytóza a
- 4) přímá indukce apoptózy [1,2].

Standardní, tzv. nahé mAbs cílí na CD38 antigen na povrchu plazmatických buněk znamenaly zásadní zlom a přínos pro pacienty s mnohočetným myelomem (MM) a od roku 2015 se velmi

rychle staly standardní součástí léčby [3]. Hlavním představitelem této skupiny je daratumumab, dále poté isatuximab a na CS1 mířený elotuzumab.

Tato edukační přednáška je nicméně věnována zejména moderním imunoterapeutickým přístupům, které zatím nepředstavují standardní součást anti-myelomové léčby. Z první skupiny monoklonálních protilátek jsou to zejména:

### Konjugované monoklonální protilátky (antibody drug conjugates – ADC)

ADCs představují jednu z velmi rychle se rozvíjejících tříd protinádorových léků, kdy protilátka je připojena k jedné nebo více molekul cytotoxické látky [4]. Když se ADC naváže na povrch nádorové buňky, cytotoxická látka je typicky uvolněna, internalizována do cytoplazmy a následně zabíjí cílovou buňku. Belantamab mafodotin (Blenrep, GlaxoSmithKline, belamaf) je první představitel této skupiny léků, který se skládá z monoklonální protilátky cílené proti B cell maturation antigen (BCMA), která je konjugována k inhibitoru mikrotubulů (monomethyl auristatin – MMAF). Belamaf byl schválen v roce 2020 americkou FDA v monoterapii u relabovaných refrakterních pacientů s MM, kteří byli předlčení minimálně 4 liniemi léčby obsahující anti-CD38 monoklonální protilátku, proteasomový inhibitor a imunomodulační lék [5].

### Bispecifické protilátky (T cell engagers – TCEs)

Bispecifické protilátky mohou být obecně popsány jako molekuly designované k tomu, aby rozpoznaly dva odlišné antigeny. Přesněji tak, aby se vázaly jednak na antigen exprimovaný na povrchu nádorové buňky a zároveň aby vázaly cytotoxické efektorové imunitní buňky, tj. nejčastěji T lymfocyty nebo NK buňky. Tyto efektorové buňky jsou následně aktivovány a likvidují cílové nádorové buňky v jejich blízkosti [6]. Tento léčebný přístup je nyní dramaticky zkou-

mán. Nejčastějším cílovým antigenem je již zmíněný BCMA a nejčastěji aktivovanými buňkami jsou T lymfocyty, tedy konstrukt BCMA × CD3. V tuto chvíli je celá řada molekul ve vývoji ve fázích 1–3 klinických hodnocení s velmi slibnými výsledky dosahující celkové léčební odpovědi okolo 80 % u silně předlčených MM pacientů a dobrým bezpečnostním profilem. Nejdále ve vývoji jsou následující molekuly: AMG701 (Amgen), CC-93269 (Celgene), elranatamab (Pfizer), teclistimab (Janssen) a další.

### BUNĚČNÁ TERAPIE

Buněčná terapie je dominantně reprezentována technologií CAR – chimérický antigenní receptor, kterým jsou nejčastěji vybaveny T lymfocyty – CAR-T buňky. Principem je modifikace pacientových vlastních T lymfocytů, které jsou vybavené specifickým receptorem, jenž rozpoznává antigen na povrchu nádorových buněk. Takto upravené vlastní T lymfocyty jsou po lymfodepleční léčbě navraceny pacientovi, kde mají za úkol vyhledat a zabít buňky nádoru bez nutnosti klasické prezentace antigenu. Použití CAR-T buněk přináší specifické a nové typy toxicit, a to zejména cytokin release syndrom a neurotoxocitu [7].

V případě MM a CAR terapie je nejatraktivnějším a nejvíce studovaným cílem opět BCMA. U těžce předlčených MM pacientů prokázala léčba CAR-T buňkami neuvěřitelné a bezprecedentní výsledky [8]. V současnosti jsou ve vývoji dva produkty: 1) idecabtagene vicleucel (Bristol Myers Squibb / Celgene) a 2) ciltacabtagene autoleucel (Janssen). Idecabtagene vicleucel (Abecma), byl schválen v březnu 2021 Americkou FDA pro léčbu pacientů s relabovaným-refrakterním MM po 4 předchozích liniích léčby obsahující anti-CD38 mAbs, PI a IMiD [9]. Schválení ciltacabtagene autoleucel je očekáváno co nevidět vzhledem ke slibným výsledkům studie Cartitude-1 clinical, kde celková léčebná odpověď dosáhla 97 % u pacientů s mediánem 5 předchozích linií léčby [10].



## Literatura

1. Jelinek T & Hajek R. Monoclonal antibodies – A new era in the treatment of multiple myeloma. *Blood Reviews* 2016;30:101–110.
2. Moreno L, Perez C, Zabaleta A, et al. The mechanism of action of the anti-CD38 monoclonal antibody isatuximab in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 2019;25:3176–3187.
3. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* 2015;373:1207–1219.
4. Demel I, Bago JR, Hajek R & Jelinek T. Focus on monoclonal antibodies targeting B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: update 2021. *British Journal of Haematology* 2021;193:705–722.
5. Lonial S, Lee HC, Badros A, et al. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *The Lancet. Oncology* 2020;21:207–221.
6. Lancman G, Richter J & Chari A. Bispecifics, trispecifics, and other novel immune treatments in myeloma. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2020; 264–271.
7. Teoh PJ & Chng WJ. CAR T-cell therapy in multiple myeloma: more room for improvement. *Blood Cancer Journal* 2021;11:84.
8. Donk NWCJ van de, Usmani SZ & Yong K. CAR T-cell therapy for multiple myeloma: state of the art and prospects. *The Lancet Haematology* 2021;8:e446–e461.
9. Munshi NC, Anderson LD, Shah N, et al. Idecabtagene vicleucef in relapsed and refractory multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine* 2021;384:705–716.
10. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, et al. Ciltacabtagene autoleucef, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet (London, England)* 2021;S0140-6736(21)00933–8.

# Personalizace léčby Hodgkinova lymfomu

Procházka V.

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

## ÚVOD

Hodgkinův lymfom (HL) představuje modelovou onkologickou diagnózu, u které bylo historicky úspěšně zavedeno mnoho základních konceptů onkologie. Od prostého prvního popisu této nosologické jednotky Thomasem Hodgkinem (1832) přes první úspěšné nasazení systémové polychemoterapie (Danny DeVita, 1969), průlomovou indikaci funkčních zobrazovacích metod (1991) až po využití volné nádorové DNA (2015) pro genotypizaci nádoru. V posledních letech došlo k razantnímu pokroku na poli poznání biologie HRS buňky, jejího mikroprostředí a prognostických faktorů nemoci a k zavádění moderní „necystostatické“ terapie. Komplex těchto poznatků umožňuje vytvořit základ pro aplikaci postupů vysoce individualizované léčby s cílem dosažení vyléčení nemocných za cenu minimálních akutních i pozdních následků. Cílem tohoto souhrnu je podat přehled nových postupů pro budoucí volbu terapie u nemocných s HL.

## FUNKČNÍ ZOBRAZOVACÍ VYŠETŘENÍ

Terapie mladších nemocných je založena na konceptu riziku uzpůsobené léčby na základě použití historických parametrů reflektujících rozsah nemoci (Ann Arbor), serologickou aktivitu lymfomu (FW) a jeho klinické projevy (B-symptomy). Současné studie ukazují, že využití vypočítaných parametrů funkčních zobrazovacích metod (PET-CT) poskytuje větší jistotu v identifikaci rizikových nemocných vyžadujících intenzivní (a potenciálně toxickou) terapii [1,2].

V případě nemocných s časným stádiem HL prokázala studie H10, že jak celkový metabolický objem tumoru (*total metabolic tumor volume* – TMTV) při dia-

gnóze, tak výsledek průběžného (interim) PET-CT po 2 cyklech režimu ABVD (i-PET-2) byly nezávislými prediktory intervalu do progresu choroby (*progression-free survival* – PFS). Velká masa nádoru při diagnóze (nad 148 cm<sup>3</sup>) a pozitivní iPET-CT-2 (Deauville 4-5) byly asociované s 5letým PFS na úrovni pouhých 25 % [3].

V případě pacientů s pokročilým HL (stádia IIB-IV) prokázala studie RATHL asociaci vypočítaného parametru celkové glykolýzy (*total lesion glycolysis* – TLG), nikoli však TMTV s PFS. Nemocní s vysokou mírou TLG (nad 3 318 g) mají téměř 3× vyšší riziko selhání terapie v 5 letech ve srovnání s nemocnými s nízkým TLG (31 vs 13,1 %) [4]. Studie AHL 2011 LYSA identifikovala vysoce rizikovou kohortu nemocných s vysokým úvodním TMTV (nad 350 ml), kteří byli po 2 cyklech terapie eskalovaným režimem BEACOPP PET-pozitivní (Deauville 4-5). Tito pacienti měli PFS ve 2 letech pouze 61 %, ve srovnání s 88 % a 96 % u nemocných s vysokým TMTV/negativním iPET-2 a nízkým TMTV/negativním iPET-2 [5].

Dalším krokem v možnostech analýzy funkčních zobrazovacích metod je komplexnější „radiomická“ analýza (*radiomics analysis*) popisující detailněji heterogenitu akumulace FDG, distribuci PET+ lokalit či jiné vypočítané parametry. Příkladem může být analýza 174 nemocných s relabovaným a/nebo refrakterním HL (RR HL), u kterých byly kalkulovány kromě TMTV další „*dispensity features*“ popisující distribuci a charakter ložisek nádoru. Byl vytvořen radiomický model, který, pokud byl kombinován s klinickými parametry, dosahoval vysokou předpovědní jistotu (AUC 0,90) pro relaps/progresi a rozdělil nemocné na ty s vysokým, resp. ní-

kým rizikem progresu (čas do progresu ve 3 letech 38 vs. 90 %;  $p < 0,001$ ) [6]. Zdá se tedy, že využití vypočítaných parametrů PET/CT, jako jsou TMTV, TLG či „*radiomická*“ analýza, má potenciál zpřesnit identifikovat nemocné v riziku selhání léčby, a to i tehdy, byli-li tito při vyšetření iPET negativní.

## VYŠETŘENÍ VOLNÉ NÁDOROVÉ DNA

Detekce volné nádorové DNA (ctDNA) z periferní krve u nemocných s HL se stává velmi perspektivní metodou pro odhad masy nádoru, jeho genotypizaci, monitoraci dynamiky léčebné odpovědi i minimální reziduální nemoci. Prospektivní observační studie IOSI-EMA-003 (NCT03280394) detekovala ctDNA u 135 dosud neléčených nemocných s HL. Medián koncentrace ctDNA při dg. byl 358,5 hGE/ml s tím, že nemocní s hodnotou nad 1 500 hGE/ml dosahovali podstatně horšího PFS ve 3 letech (44,4 vs. 86,9 %;  $p < 0,0001$ ) než nemocní s hodnotou nižší. Hodnota ctDNA predikovala osud nemocných bez ohledu na jejich klinické stádium. Kombinace ctDNA nad 1 500 hGE/ml a vysoké IPS skóre (nad 3) pak identifikuje vysoce rizikovou skupinu nemocných s 3letým PFS dosahujícím pouhých 33,3 % [7]. Dalším krokem v analýze ctDNA je stanovení konkrétních mutací asociovaných s HL. Bylo zjištěno, že pomocí citlivých technik sekvenování nové generace je možno tyto mutace zachytit až u 93 % nemocných. Práce multicentrické skupiny BREACH analyzovala data 177 neléčených nemocných [8]. Bylo zjištěno, že koncentrace ctDNA koreluje s masou nádoru, klinickými charakteristikami, mužským pohlavím, přítomností B-symptomů, a „*masou*“ HRS buněk. Po terapii hladina ctDNA velmi rychle klesá

u chemosenzitivních nemocných a naopak. CtDNA je cenným zdrojem pro genotypizaci nádoru, umožňující nalézt kandidátní mutace/genetické změny, které korelují s odpovědí jak na konvenční terapii, tak na léčbu novými „immune check-point“ inhibitory [8,9].

## ZÁVĚR

V posledních letech pozorujeme pokrok na poli zobrazovacích metod a molekulární genetiky, které nám nabízejí nové možnosti hodnocení charakteru HL, jeho rozsahu, heterogenity a konečně i dostupného vyšetření genomu HRS buňky. Tyto postupy, opírající se o sofistikované analýzy FDG-PET a volné nádorové DNA, vyžadují mimořádnou erudici a náročné technologické vybavení a těsnou interdisciplinární spolupráci ze strany klinika. Standardizace a uvedení těchto metod však otevírá zcela nové možnosti pro

precizní posouzení rizika lymfomu, sledování průběhu léčby v „reálném čase“, dosud netušené možnosti individualizace léčby na základě genotypizace HL a následně také citlivé neinvazivní sledování minimální reziduální choroby.

## Grantová podpora

Podpořeno granty IGA-LF-2021-001 a MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).

## Literatura

1. Johnson P, Federico M, Kirkwood A, et al. Adapted treatment guided by interim PET-CT scan in advanced Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2016;374(25):2419–2429.
2. Trotman J, Barrington SF. The role of PET in first-line treatment of Hodgkin lymphoma. *Lancet Haematol.* 2021;8(1):e67–e79.
3. Cottreau A-S, Versari A, Loft A, et al. Prognostic value of baseline metabolic tumor volume in early-stage Hodgkin lymphoma in the standard arm of the H10 trial. *Blood.* 2018;131(13):1456–1463.
4. Pike LC, Kirkwood AA, Patrick P, et al. Can baseline PET-CT features predict outcomes

IN advanced Hodgkin lymphoma? A prospective evaluation of UK patients in the RATHL trial (CRUK/07/033). *Hematol Oncol.* 2017;35(S2):37–38.

5. Casasnovas RO, Kanoun S, Tal I, et al. Baseline total metabolic volume (TMTV) to predict the outcome of patients with advanced Hodgkin lymphoma (HL) enrolled in the AHL2011 LYSA trial. *J Clin Oncol.* 2016;34(15\_suppl):7509.
6. Driessen J. et al. Predictive value of quantitative 18F-FDG-PET-CT radiomics analysis in 174 patients with relapsed/refractory classical Hodgkin lymphoma. *Hematol. Oncol.* 2021;39(Suppl.2):abstract 021.
7. Spina V. et al. circulating tumor DNA is a prognostic biomarker in classic Hodgkin lymphoma. *Hematol. Oncol.* 2021;39(Suppl.2):abstract 070.
8. Buedts L, Wlodarska I, Finalet-Ferreiro J, et al. The landscape of copy number variations in classical Hodgkin lymphoma: a joint KU Leuven and LYSA study on cell-free DNA. *Blood Adv.* 2021;5(7):1991–2002. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003039.
9. Wienand K, Chapuy B, Stewart C, et al. Genomic analyses of flow-sorted Hodgkin Reed-Sternberg cells reveal complementary mechanisms of immune evasion. *Blood Adv.* 2019;3(23):4065–4080. doi: 10.1182/bloodadvances.2019001012.

# Diagnostika a léčba periferních T-lymfomů v roce 2021

Janíková A.

FN Brno

T-lymfomy tvoří zhruba 6–10% všech Nehodgkinových lymfomů a patří k velmi heterogenní skupině nádorů, která dle poslední WHO klasifikace (2016) čítá 29 podtypů. Diagnostika stejně jako léčba T-lymfomů patří k velmi obtížným úkolům medicínské praxe. Globální léčebné výsledky jsou u pacientů s T-lymfomy podstatně horší než u pacientů s B-lymfomy. Tento rozdíl je způsoben několika faktory: 1) nízkou četností T-lymfomů vs. B-lymfomů; 2) současně obrovskou diverzitou a 3) nedostatkem proveditelných klinických studií.

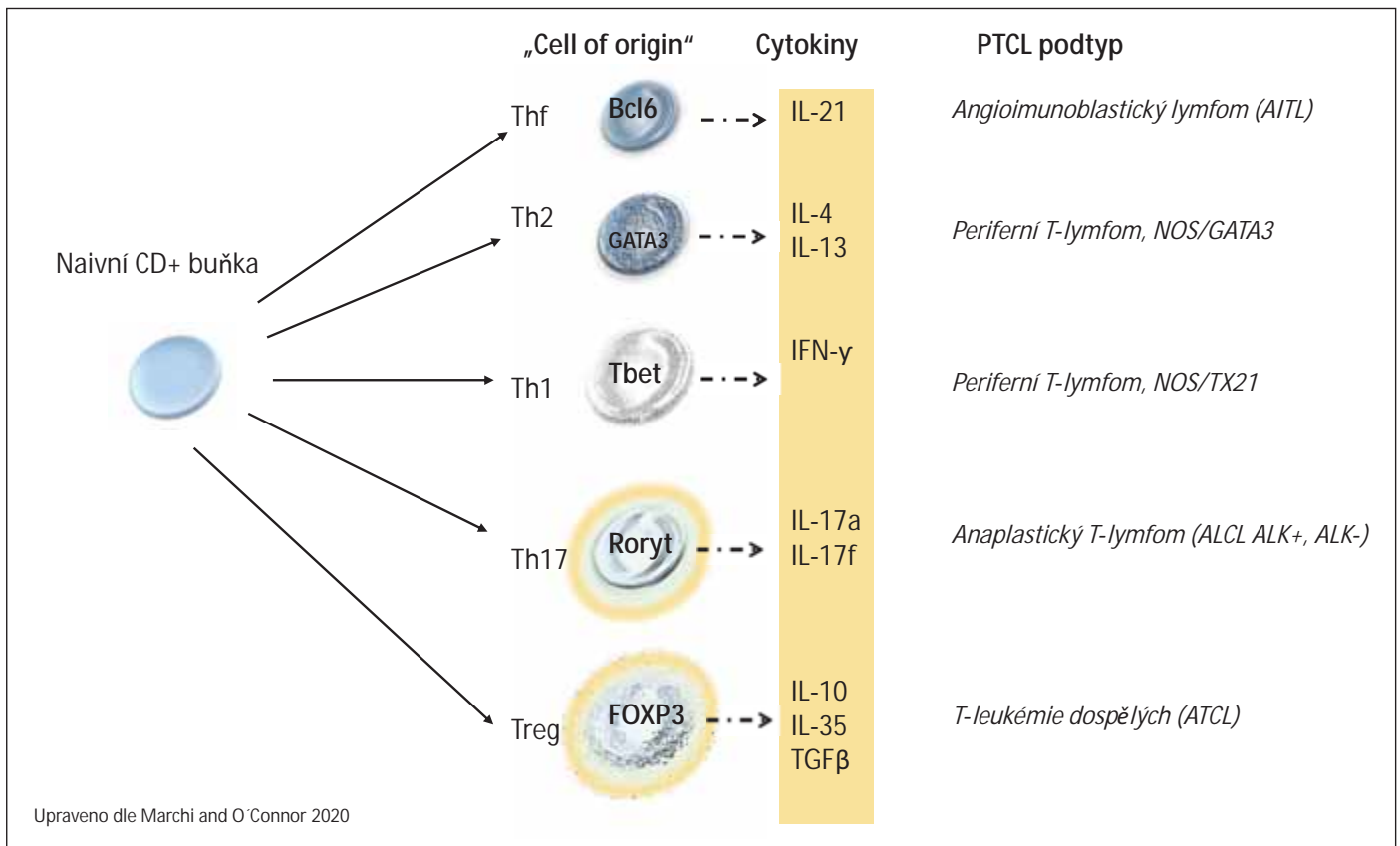
Klíčem ke změně této situace je detailní a správné porozumění biologii jednotlivých nádorových podtypů PTCL. Zrod T-buněk (nádorových i fyziologických) začíná v kostní dřeni, odkud putují do thymu, aby zde prodělaly rearanžmá

genu pro T-receptor (TCR) a staly se zralými lymfocyty. Heterogenita T-lymfomů odráží široké spektrum fyziologických forem T-lymfoidních buněk produkujících různé cytokiny, které potom hrají roli v signalizaci jiných buněk imunitního systému. Teoretický vývoj naivního CD4+ lymfocytu do různých buněk původu (cell of origin – COO) T-lymfomů je znázorněn schematicky na obrázku (obr. 1).

Aktuální klasifikace WHO 2016 (Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues) definuje 4 základní kategorie zralých T-neoplázií: 1) diseminované/leukemické; 2) nodální; 3) extranodální a 4) kožní (tab. 1). Kategorie dosud historicky nazývaná jako periferní T-lymfomy (což se může zaměnit s názvem jednotky „Periferní T-lym-

fom, NOS“) je v aktuální WHO klasifikaci přesněji označena jako „zralé T-neoplázie“ (mature T-cell neoplasms – MTCLs), což lépe reflektuje fakt, že T-buňky prošly rearanžmá TCR v thymu.

Změny ve WHO klasifikaci 2016 se týkají zejména zavedení nové zastřešující entity nazvané „Nodální lymfomy s fenotypem T-folikulárního helperu (TFH)“, kam patří AITL (Angioimmunoblastický T-lymfom) a dvě provizorní jednotky: Folikulární T-lymfom a Nodální periferní T-lymfom s TFH fenotypem. Tyto dvě jednotky spadaly dříve pod PTCL NOS (periferní T-lymfom, not otherwise specified). Skupina lymfomů odvozena od Th-lymfocytu folikulárního centra sdílí několik společných mutací, diagnóza vyžaduje prokázání 2 ze 3 fenotypových znaků typických



Obr. 1.

Tab. 1.

LYMFOMY ZE ZRALÝCH T-BUNĚK			
NODÁLNÍ	EXTRANODÁLNÍ	KOŽNÍ	LEUKEMICKÉ
PTCL-NOS	ENKTL, nazální	MF/Sézary syndrom	HTLV-1 leukémie/lymfom dospělých
AITL	EATL	Podkožní panniculitis-like T-lymfom	T-prolymfocytární leukémie
ALCL systémový ALK+/ALK-	MEITL	Primární kožní CD30+ LPD	T-velkobuněčná granulární leukemie (LGL)
Folikulární T-lymfom	Indolentní T-lymfoproliferace GIT	Lymfomatózní papulomatóza	Agresivní NK-leukémie
Nodální PTCL s T-folikulárním helper fenotypem	Hepatosplenický TCL	Primární kožní ALCL	
Systémový EBV+ T-lymfom dětí	ALCL asociovaný s prsním implantátem	Primární kožní γδ T-lymfom	
Hydroa vacciforme like lymfoproliferace	Chronická NK lymfoproliferace	Primární kožní CD8+ agresivní T-lymfom Primární kožní CD4+ T-lymfom	

pro TFH buňky (CD4, CD10, bcl6, PD-1, CXCL13).

Kategorie ALCL je aktuálně rozdělena do 4 jednotek s odlišným biologickým chováním a fenotypem. ALCL je definován konstantní silnou expresí CD30 na T-lym-

focytech a dle exprese ALK se vyčleňuje podtyp ALK+, který je agresivní lymfoproliferací typickou pro dětský a mladší dospělý věk. Systémový ALCL ALK- je agresivní choroba s horší prognózou oproti ALK+ ALCL s typickou expresí DUSP22,

T63 a aktivní JAK/STAT signalizací, které určují prognózu ALCL ALK- pacientů. Vysloveně indolentní průběh i léčbu mají další dvě jednotky, a sice kožní ALCL a ALCL asociovaný s prsním implantátem (oba podtypy bývají zpravidla také ALK-).

Hlubší vhled do biologie a patogeneze T-lymfomů přinesla technika profilování genové exprese (GEP), která jednoznačně vymezila očekávané ALK+ a ALK- ALCL, ale také vedla k upřesnění nebo změně diagnózy u asi 35–40 % pacientů s jinými T-lymfomy diagnostikovanými histopatologicky. Např. mezi 152 případy histologických PTCL NOS bylo dle GEP identifikováno 14 AITL a 11 ALCL. Přibližně 20 % PTCL NOS případů je podobných AITL, neboť jsou odvozeny od T-folikulárního helperu, zatímco zbývající PTCL NOS jsou spojeny s expresním profilem TH1 (PTCL-TBX21/Tbet) nebo TH2 (PTCL-GATA3) buněk.

U většiny podtypů zralých T-lymfomů jsou ve velké míře pozorovány epigenetické změny, které jsou reflektovány v klinické praxi poměrně konsistentní odpovědí (celková odpověď kolem 25 %) na inhibitory histonových deacetyláz (HDAC). Mutace řady genů jsou zahrnuty v metylaci DNA (např. TET2, IDH2, DNMT3). Tyto mutace lze nalézt signifikantně častěji u AITL nebo PTCL s TFH fenotypem.

Léčba T-lymfomu ze zralých buněk zůstává velkou výzvou. Léčebná doporučení se v tomto případě nemohou opřít o robustní randomizované studie. Klinikové se musí spolehnout na interpretaci dostupných dat z retrospektivních nebo malých obvykle jednoramenných studií, nové patofyziologické poznatky a vlastní zkušenosti. Režimy chemoterapie (CHOP) byly přežaty extrapolací dat B-NHL a nesplňují představy dostatečně účinné léčby. V první linii lze s úspěchem použít zejména u mladších pacientů kombinace s etoposidem (CHOEP), která se dle různých studií ukazuje být účinnější než CHOP. Dle výsledků ojedinelé velké prospektivní randomizované studie ECHELON2 je u pacientů s CD30+ T-lymfomem účinnější kombinace brentuximab vedotin +CHP vs. CHOP (medián do progresu 48,2 měsíců

vs. 20,8). Poměrně zajímavé výsledky přinesla prospektivní randomizovaná studie CHOP vs. GDPT (gemcitabin, prednison, platina, thalidomid) s významně lepším 4letým OS i PFS po GDPT 53,6 vs. 66,8 % a 53 vs. 63,6 %.

Konsolidace vysokodávkovanou léčbou v rámci první linie léčby zůstává stále otázkou. Od této léčby lze očekávat u vhodných kandidátů zhruba 50% efekt v dlouhodobém přežití, což bylo potvrzeno několika prospektivními i retrospektivními studii. Přínos konsolidace v první linii dosud jednoznačně potvrzen nebyl, zůstává ale jistě dobrou volbou pro mladší pacienty s relapsem. Konsolidace vysokodávkovanou léčbou vs. alogenní transplantací rovněž nepřineslo žádný signifikantní rozdíl v přežití, zatímco po vysokodávkované léčbě byl dominujícím problémem relaps (36 % zemřelých), u alogenní transplantace to byla toxicita léčby (31 % zemřelých).

Léčba relapsu T lymfomů je velmi obtížná a prognóza pacientů velmi vážná s mediánem přežití od relapsu 5,5 měsíců. Zásadním rozhodovacím kritériem obvykle bývá, zda pacient zvládne intenzivnější léčbu či ne (včetně léčby některou z transplantací). Vzhledem k absenci standardu léčby je velmi dobré (pokud je to možné) nabídnout účast v klinické studii.

Perspektivu v léčbě zralých T-neoplázií získávají cílené léky. Prvním efektivně použitým cíleným lékem je brentuximab vedotin (imunokonjugát antiCD30 + MMAE), který byl úspěšně použit v monoterapii i kombinované léčbě. Vzhledem k epigenetické dysregulaci byli postupně registrováni pro léčbu T-lymfomů (mimo ČR) 4 HDAC: v roce 2006 vorinostat, romidepsin v roce 2009, belinostat v roce 2011 a chidamid v roce 2015 (pouze v Číně). Celkové odpovědi ve studiích fáze 2 dosahovaly kolem 25–35 % vcelku konzistentně a zdá se, že

nezávisely na stupni předléčenosti pacientů. Předpokládá se, že s postupnou lepší molekulárně biologickou stratifikací a možnými kombinacemi HDAC s jinými léky by se mohla efektivita léčby těmito preparáty zvyšovat.

Hypometylující látky 5-azacytidin a decitabin vykazují aktivitu u myeloidních malignit (AML) a odpověď se zdá dobře korelovat s mutacemi TET2, IDH1/2 a DNMT3A. Tyto mutace jsou přítomny rovněž u pacientů s AITL, u R/R AITL byla pozorována odpověď 75%. Pozoruhodnou účinnost (ORR 50 %) vykazoval u T-lymfomů duvelisib (inhibitor  $\gamma\delta$  PI3 kinázy). Aktivace JAK/STAT signalizace u AITL a ALCL evokuje využití inhibitorů JAK (ruxolitinib). ALK+ ALCL jsou dobře léčitelné ALK inhibitory s ORR 90 % (crizotinib, alektinib).

Zralé T-neoplázie se stávají v posledních letech velmi dynamickou oblastí rozvoje v diagnostice a porozumění patogeneze, ale také v nastupujících léčebných možnostech, které v budoucnu patrně změní „pověst T-lymfomů“ jako nemoci se špatnou prognózou.

## Literatura

- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition. IARC, Lyon 2017.
- Marchi E, O'Connor OA. The rapidly changing landscape in Mature T-cell lymphoma (MTCL) Biology and Management. CA Cancer J Clin. 2020;70:47–70.
- Xie C, Li X, Zeng H and Qian W. Molecular insights into pathogenesis and targeted therapy of peripheral T-cell lymphoma. Exp Hematol Oncol. 2020;9:30. doi:10.1186/s40164-020-00188-w.
- Janikova A, Chloupkova R, Campr V et al. First-line therapy for T cell lymphomas: a retrospective population-based analysis of 906 T cell lymphoma patients. Ann Hematol. 2019;98(8):1961–1972. doi: 10.1007/s00277-019-03694-y.
- Sun Y, Li L, Li X, et al. Outcomes of GDPT (gemcitabine, cisplatin, prednisone, thalidomide) versus CHOP in newly diagnosed peripheral T-cell lymphoma patients. Ther Adv Med Oncol. 2020;12:1758835920923829. doi: 0.1177/1758835920923829.

# Folikulový lymfóm – súčasné alternatívy liečby a pohľad do budúcnosti

Vranovský A.

Klinika onkohematológie LF UK a NOÚ, Bratislava

## ÚVOD

Folikulový lymfóm (FL) tvorí približne 20–25 % Non-Hodgkinových lymfómov (NHL), jeho incidencia v Európe je 4–5/100 000 obyvateľov. V rámci WHO klasifikácie nádorov hematopoetického systému patrí medzi zrelé B-bunkové lymfoproliferácie [1]. Napriek faktu, že pokročilý FL sa naďalej považuje za nevyliciteľné ochorenie, sa prognóza pacientov s FL za posledné dve dekády výrazne zlepšila, medián celkového prežívania (OS) je 15–20 rokov. Vo všeobecnosti sa folikulový lymfóm, s výnimkou FL G3b, zaraďuje medzi indolentné lymfómy a 80 % pacientov dosahuje po liečbe chemoterapiou dlhodobé remisie. Zostávajúcich približne 20 % pacientov má 5-ročné OS len 35–50 %, najmä z dôvodu skorej progresie ochorenia, či transformácie do agresívneho lymfómu.

## STAGING

PET/CT vyšetrenie je odporúčaným zobrazovacím vyšetrením pri zisťovaní iniciálneho rozsahu ochorenia, ako aj pri hodnotení liečebnej odpovede [2]. CT je naďalej akceptovanou alternatívou. PET/CT zvyšuje štádium ochorenia v porovnaní s CT vyšetrením v 10–60 % prípadov, obzvlášť dôležitú úlohu má pri potvrdení skorých klinických štádií I alebo II. Kontroverzná je rola PET/CT pri identifikácii oblastí s transformáciou FL, v štúdií GALLIUM nebol potvrdený vyšší výskyt transformácie ani u pacientov, ktorí mali lézie s  $SUV_{max} > 20$ . Na druhej strane, v nedávno publikovanej práci dosiahli pacienti s FL, ktorí mali pri iniciálnom stagingovom vyšetrení lézie s  $SUV_{max} > 18$ , signifikantne horšie prežívanie bez progresie (PFS), ak neboli liečení režimom R-CHOP [3]. Celkové

prežívanie pacientov, ktorí mali lézie s  $SUV_{max} > 18$ , však bolo v tejto štúdií nepriaznivejšie aj u pacientov liečených kombináciou R-CHOP.

PET/CT vyšetrenie ako dôkaz infiltrácie kostnej drene (KD) má pri folikulovom lymfóme nižšiu senzitivitu v porovnaní s agresívnymi NHL, či Hodgkinovým lymfómom. Z tohto dôvodu je punkcia KD stále štandardným vyšetrením pri stagingu. Avšak, ak je zjavné, že pacient bude len sledovaný a nevyžaduje liečbu („watch and wait“), je možné punkciu KD odložiť. Podobne v prípadoch, keď výsledok punkcie nijako neovplyvní terapeutický postup, je akceptovateľné punkciu KD úplne vynechať.

Folikulový lymfóm je lymfoproliferáciou, ktorá je dobre definovaná histomorfologicky, imunohistochemicky, či geneticky (t14;18). Na druhej strane však priebeh ochorenia môže byť veľmi variabilný, preto v snahe odhadnúť správanie ochorenia a tým aj prognózu pacienta, bolo vytvorených niekoľko prognostických indexov, obsahujúcich nielen klinické faktory, ale aj biologické markery (tab. 1), reflektujúce genetické zmeny nádoru a vplyv mikroprostredia. Najnovšie prognostické indexy, ako m7-FLIPI, či FLEX, sú však z dôvodu komplikovanosti výpočtu v bežnej klinickej praxi zatiaľ len ťažko použiteľné, preto stále využívame najmä tie staršie, ako FLIPI, či FLIPI 2.

## LIEČBA

### Lokalizovaná choroba (štádium I, II)

V liečbe pacientov, ktorí majú štádium I (optimálne potvrdené stagingovým PET/CT vyšetrením) je ešte stále liečbou volby rádioterapia (RT) na postihnutú

Tab. 1. Prognostické indexy pre folikulový lymfóm [upravené z 4].

Prognostický index	Rizikové skupiny	Prognostický dopad
FLIPI	Nízke riziko	91 % OS (5 rokov)
	Intermediárne riziko	78 % OS (5 rokov)
	Vysoké riziko	53 % OS (5 rokov)
FLIPI 2	Nízke riziko	80 % OS (5 rokov)
	Intermediárne riziko	51 % OS (5 rokov)
	Vysoké riziko	19 % OS (5 rokov)
PRIMA-PI	Nízke riziko	69 % PFS (5 rokov)
	Intermediárne riziko	55 % PFS (5 rokov)
	Vysoké riziko	37 % PFS (5 rokov)
FLEX	Nízke riziko	86 % PFS (3 roky)
	Vysoké riziko	68 % PFS (3 roky)
m7-FLIPI	Nízke riziko	68–77 % FFS (5 rokov)
	Vysoké riziko	22–38 % FFS (5 rokov)
POD24-PI	Nízke riziko	72–77 % FFS (5 rokov)
	Vysoké riziko	36–50 % FFS (5 rokov)

### Tab. 2. GELF kritériá pre zahájenie liečby folikulového lymfómu.

**Prítomnosť ktoréhokolvek z kritérií definuje pacienta s vysokou nádorovou záťažou**

Lymfómová masa priemeru  $\geq 7$  cm

Tri lymfatické uzliny v 3 rozličných oblastiach, každá priemeru  $\geq 3$  cm

Prítomnosť systémových príznakov

Symptomatická splenomegália

Ascites alebo pleurálny výpotok

Cytopenia (absolútny počet neutrofilov  $< 1 \times 10^9/l$  alebo počet trombocytov  $> 100 \times 10^9/l$ )

Cirkulujúce lymfómové bunky ( $> 5 \times 10^9/l$ )

oblasť v dávke 24 Gy. RT sa uplatňuje aj pri štádiu II, ak ide o oblasti obsiahnuteľné jedným ožarovacím poľom s pokiaľ možno minimálnou toxicitou. Prídanie rituximabu k RT síce zlepšuje PFS, ale nie OS. V indikovaných prípadoch možno použiť minimálnu dávku  $2 \times 2$  Gy. Tento spôsob RT je pre pacienta komfortný a málo toxický, počet recidív je však vyšší, v porovnaní s dávkou 24 Gy.

### Pokročilé ochorenie (štádium III–IV)

V liečbe pokročilého FL stále platí premisa, že asymptomatického pacienta nie je nutné okamžite liečiť, možno ho observovať („*watchful waiting*“). Nasadenie rituximabu u bezpríznakového pacienta podľa očakávania zlepšuje PFS, nie však OS [5]. Liečba sa iniciuje na základe prítomnosti niektorého z tzv. GELF kritérií (tab. 2).

V súčasnosti už celkom neplatí paradigma, že FL je ochorenie s opakovanými recidívami a skraticujúcimi sa remisiami. Aj na základe výsledkov americkej štúdie National Lymphocare Study vieme, že pacienti, ktorí po prvolíniovej chemoimunoterapii progredujú, či relabujú v priebehu prvých dvoch rokov od zahájenia liečby, majú obzvlášť nepriaznivú prognózu [6]. Väčšina tých ostatných však zažíva dlhodobé remisie s mediánom OS 20 rokov. Problémom zostáva, ako čo najpresnejšie identifi-

kovat skupinu pacientov so zlou prognózou, tzv. POD24 („*progression of disease within 24 months*“) a následne, akú liečbu im poskytnúť.

Štandardnou prvolíniovou liečbou je chemoimunoterapia – kombinácia monoklonovej protilátky antiCD20 (rituximab alebo obinutuzumab) s cytostatickou liečbou, najčastejšie ide o kombinácie B-R (bendamustín, rituximab), R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicín, vinkristín, prednizon) alebo R-CVP (rituximab, cyklofosfamid, vinkristín, prednizon). Vo všeobecnosti sa dnes, najmä z dôvodu nižšej toxicity, najviac používa kombinácia B-R, ale v prípade podozrenia na možnú transformáciu (zvýšená koncentrácia LDH, B-symptómy, hyperkalcémia, vysoké hodnoty SUV) uprednostňujeme R-CHOP. R-CVP preferujeme u starších ( $> 80$  rokov) a komorbídnych pacientov. Kombinácie s obinutuzumabom, v porovnaní s rituximabom, dosahujú lepšie PFS a vyššie percento MRD negativity, ale aj o niečo vyššiu toxicitu [7]. Na Slovensku obinutuzumab nie je poisťovňami uhrádzaný a podobne ani tzv. chemo-free režim R2 (rituximab, lenalidomid), ktorý získava popularitu najmä v USA. Vysokodávkovaná liečba s autológou, ani alogénnou transplantácii nemajú miesto v prvolíniovej liečbe folikulového lymfómu.

### Udržiavacia liečba

V predchádzajúcich rokoch bola udržiavacia liečba rituximabom štandardom takmer u každého pacienta s FL, ktorý dosiahol remisiu po indukčnej chemoimunoterapii. V súčasnosti je situácia už odlišná, rozhodujeme sa individuálne pri každom pacientovi. Príčin je niekoľko, spomenúť treba absenciu dôkazu zlepšenia celkového prežívania (štúdie PRIMA, GALLIUM), riziko závažných infekcií najmä po prvolíniovej liečbe obsahujúcej bendamustín (GALLIUM) a v poslednom rade pandémiu COVID-19.

### Liečba relapsu

Ak ide o relaps pacienta, ktorý v prvolíniovej liečbe absolvoval len RT alebo

monoterapiu rituximabom, pri relapse sa využíva niektorý z vyššie uvedených režimov chemoimunoterapie. V prípade pacientov, ktorí relabujú po prvolíniovej chemoimunoterapii, sa zväčša volí režim, ktorý pacient nedostával (R-CHOP po B-R a naopak). U krehkých pacientov s viacročnou remisiou po monoterapii rituximabom možno túto liečbu opakovať. Štúdia GADOLIN potvrdila účinnosť kombinácie bendamustín + obinutuzumab v skupine rituximab refraktérnych pacientov [8]. V štúdiu AUGMENT, porovnávajúcej kombináciu R2 versus R, bol medián PFS v ramene s lenalidomidom 39 mesiacov, v ramene s monoterapiou R len 14 mesiacov [9]. Na základe týchto výsledkov sa R2 stalo vhodnou liečebnou alternatívou pacientov s R/R FL. V prípade dostupnosti lieku je ďalšou možnosťou liečby aj rádioimunoterapia (ibritumomab tiuxetan). Dobre tolerovaná a účinnou paliatívnu liečbou je RT  $2 \times 2$  Gy.

Dnes stále nevieme, aký je optimálny manažment pacientov s POD24. Niektoré retrospektívne analýzy naznačujú, že u takmer 50 % pacientov s POD24 je príčinou skorého zlyhania terapie skrytá, iniciálne neodhalená transformácia do agresívneho lymfómu [10]. U mladších, fit pacientov s transformáciou alebo skorým relapsom sa odporúča vysokodávkovaná liečba s autológou transplantáciou (ASCT). Alogénna transplantácia, aj s ohľadom na vysokú peritransplantačnú mortalitu u pacientov s FL, je indikovaná zriedkavo, napr. u mladších pacientov s relapsom po ASCT a/alebo masívnou infiltráciou kostnej drene.

Udržiavacia liečba monoklonovou protilátkou antiCD20 sa pri relapse FL neodporúča u pacientov, ktorým sa choroba vrátila počas podávania udržiavacej liečby v rámci prvolíniovej terapie.

### Nové lieky a kombinácie

V súčasnosti prebieha veľké množstvo predklinických a klinických skúšaní liekov so sľubnou účinnosťou u pacientov s FL, niektoré z nich sú už registrované aj v EÚ (idelalisib), iné zatiaľ len

**Tab. 3. Nové lieky a kombinácie v liečbe R/R folikulového lymfómu.**

Názov	Cieľ	Štúdia	Počet pacientov	ORR (%)	CR (%)	Medián PFS (mesiace)
Idelalisib	PI3K $\delta$	fáza II	72	66	14	11
Copanlisib	PI3K $\alpha\delta$	fáza II	104	59	20	69
Duvelisib	PI3K $\delta\gamma$	fáza II	83	42	1	10
Umbralisib	PI3K	fáza IIb	117	43	3	mDOR 11
Tazemetostat	EZH2mut	fáza II	45	69	13	14
Axi-cel	CD19	fáza II	124	94	80	nedosiahnutý
Tisagenlecleucel	CD19	fáza II	98	86	66	PFS (5M) 76 %
Mosunetuzumab	CD3/CD20	faáza I	62	68	50	12
Ibrutinib	BTK	fáza II	40	35	17	14
Venetoclax	BCL2	fáza II	29	34	10	mDOR 10
Nivolumab	PD1	fáza II	10	40	10	NR

Axi-cel – axicabtagene ciloleucel, ORR – celkové odpovede, CR – kompletné remisie, PFS – prežívanie bez progresie, mDOR – medián trvania odpovede, NR – neuvedený

v USA (copanlisib, duvelisib, umbralisib, tazemetostat, axicabtagene ciloleucel), u viacerých ďalších je schválenie pravdepodobné v blízkej budúcnosti (mosunetuzumab, glofitamab, polatuzumab vedotín, magrolimab). Podľa doterajších výsledkov štúdií s ibrutinibom, či venetoklaxom sa zdá, že tieto lieky, s vysokou účinnosťou v terapii iných indolentných lymfoproliferácií, majú v liečbe R/R FL len obmedzenú účinnosť. Skupina PI3K inhibítorov, z ktorých idelalisib je aj v Európe registrovaný na liečbu R/R FL, dosahuje pomerne vysokú účinnosť v liečbe FL. Jednotlivé molekuly sa odlišujú izoformou PI3K, ktorú inhibujú a rozličným spektrom nežiaducich účinkov, ktoré nie sú identické pre celú skupinu. Podľa prebiehajúcich štúdií sa zdá, že budú vhodnými kandidátmi aj do kombinácie s inými protilymfómovými liekmi. CAR T liečba, ktorá nachádza už niekoľko rokov uplatnenie v liečbe transformovaného FL, bola tento rok na základe výsledkov štúdie ZUMA 5 schválená aj do 3. a ďalšej línie liečby FL (zatiaľ len v USA). Viac ako 90 % odpovedí, z toho 60 % kompletných remisí a trvanie odpovedí predstavujú nádej pre pacientov, ktorí túto liečbu absolvujú. V neposlednom rade aj v liečbe R/R folikulového lymfómu prebieha množstvo klinických skúšaní s bi-

špecifickými protilátkami, či konjugátmi protilátky a lieku (ADC). Sumár inovatívnych liekov na R/R folikulový lymfóm je v tab. 3.

## ZÁVER

Napriek faktu, že nemalá časť pacientov s folikulovým lymfómom sa dožíva rovnakého veku, ako bežná populácia, menšia časť pacientov s FL zažíva skorý relaps ochorenia a/alebo transformáciu ochorenia do agresívneho lymfómu. Práve pre tieto skupiny pacientov je potrebná ich skorá identifikácia a nasadenie terapie, ktorá zvýši ich šance na dlhodobé prežívanie, či dokonca vyliečenie. V súčasnosti prebiehajúce predklinické a klinické štúdie predstavujú nádej, že sa podarí odstrániť viaceré kontroverzie ohľadne optimálneho manažmentu pacientov s FL, ako aj implementovať nové lieky a liečebné postupy.

## Literatúra

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. (revised). Lyon, France: IARC; 2017.
2. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano Classification. *J Clin Oncol.* 2014;32:3059–3068.

3. Strati P, Ahmed MA, Fowler NH, et al. Pre-treatment maximum standardized uptake value predicts outcome after frontline therapy in patients with advanced stage follicular lymphoma. *Haematologica.* 2020;105(7):1907–1913. doi: 10.3324/haematol.2019.230649.
4. Casulo C. Upfront identification of high-risk follicular lymphoma. *Hematological Oncology.* 2021; 39(S1):88–93.
5. Ardeshtna KM, Qian W, Smith P, et al. Rituximab versus a watch-and wait approach in patients with advanced-stage, asymptomatic, nonbulky follicular lymphoma: an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15:424–435.
6. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, et al. Early relapse of follicular lymphoma after rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone defines patients at high risk for death: an analysis from the National LymphoCare Study. *J Clin Oncol.* 2015;33(23):2516–2522.
7. Marcus R, Davies A, Ando K, et al. Obinutuzumab for the first-line treatment of follicular lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377:1331–1344.
8. Cheson BD, Chua N, Mayer J, et al. Overall survival benefit in patients with rituximab-refractory indolent non-hodgkin lymphoma who received obinutuzumab plus bendamustine induction and obinutuzumab maintenance in the GADOLIN study. *J Clin Oncol.* 2018;36(22):2259–2266.
9. Leonard JP, Trneny M, Izutsu K, et al. AUGMENT: a phase III study of lenalidomide plus rituximab versus placebo plus rituximab in relapsed or refractory indolent lymphoma. *J Clin Oncol.* 2019;37(14):1188–1199.
10. Freeman CL, Kridel L, Moccia AA, et al. Early progression after bendamustine-rituximab is associated with high risk of transformation in advanced stage follicular lymphoma. *Blood.* 2019;134(9):761–764.



# Akutní myeloidní leukémie

Mikulenková D.<sup>1</sup>, Campr V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ÚHKT, Praha

<sup>2</sup> FN Motol, Praha

Akutní myeloidní leukémie (AML) je heterogenní skupina onemocnění, jejichž příčinou je porucha na úrovni kmenové buňky či myeloidních prekursorů. Dle revidovaného 4. vydání WHO klasifikace tumorů hematopoetické a lymfoidní tkáně z roku 2016 je AML členěna do několika skupin; AML s rekurentními genetickými abnormalitami definované přítomností fúzních či mutovaných genů; AML s anamnézou chemoterapie v předchorobí (postterapeutická AML); myeloidní sarkom s extramedulární tumoriformní infiltrací blastickými buňkami; a nečastá AML u pacientů s Downovým syndromem. Ke stanovení dalších dvou skupin AML je nutné morfoloogické zhodnocení kostní dřeně. Patří sem AML s dysplastickými rysy; podmínkou pro stanovení této diagnózy je přítomnost dysplastických změn u více než 50 % buněk dvou a více myeloidních linií. AML, které se nepodaří zařadit do těchto skupin, se klasifikují podle FAB klasifikace z roku 1976 a jsou členěny dle toho, zda mají převahu myeloblastů, jestli je v myelogramu vyzářavající složka, či je přítomna ve více než 20 % monocytopenie; nebo v aspirátu kostní dřeně převažují monoblasty či monocyty. Do této skupiny jsou začleněny při prvním vyšetření všechny AML, neboť vstupně do 1–2 hodin po odběru aspirátu (čas,

do kterého je hodnotící cytolog schopen stanovit diagnózu AML) genetický podklad choroby není znám.

V určitých případech je ke stanovení diagnózy AML kruciální histologické vyšetření. Obecně je histologické vyšetření trepanobiopsie kostní dřeně bráno jako metoda pomocná, spolehlivě určí zejména celkovou buněčnost v kostní dřeni a distribuci jednotlivých buněčných populací. Význam trepanobiopsie stoupá v případech tzv. suché punkce (při silné fibrotizaci dřeně, tzv. packed marrow, u hypocelulární akutní leukémie nebo při extenzivní nekrotizaci), kdy se stává jedinou metodou s dostupným diagnostickým materiálem. Histologické vyšetření pomáhá při diferenciální diagnostice myelodysplastického syndromu (MDS) MDS a AML, u sekundární akutní leukémie a k vyloučení nehematologické malignity. Častou indikací trepanobiopsie je též sledování průběhu terapie a diagnostika extramedulárních leukemických infiltrátů a myeloidního sarkomu.

AML je cytologicky definována přítomností blastických buněk v počtu  $\geq 20\%$  v nátěru periferní krve (PK) či v aspirátu kostní dřeně (KD). Myelogram je nutné hodnotit na minimálně 500 jaderných buněk. Do blastických elementů řadíme myeloblasty, monoblasty, promono-

cyty, megakaryoblasty, leukemické promyelocyty a patologické erytroblasty u AML M6, což je čistá erytroidní leukémie, u které je nutná přítomnost  $> 80\%$  erytroblastů a  $\geq 30\%$  tvoří proerytroblasty. V diagnostice se využívá cytochemické vyšetření, které určí příslušnost k myeloidní linii (myeloperoxidáza, Sudanová čerň B), či pomůže určit patologii v červené řadě (PAS reakce, vyšetření železa); barvení na přítomnost nespecifických esteráz zařadí buňky do monocytopenie. Raritně je ale diagnóza AML obtížná a cytologickým zhodnocením nátěru PK a KD ji nelze stanovit.

Konečná diagnóza AML je určena kompletním vyšetřením cytomorfoloogickým (někdy zahrnuje i histologické a imunohistochemické vyšetření KD), vyšetřením průtokovou cytometrií a genetickým vyšetřením molekulárních markerů, které určí prognózu pacienta a sledovací marker a definuje terapeutický proces.

## Literatura

- Hayhoe FGJ, Quaglino: Haematological Cytochemistry Churchill Livingstone, 1994.  
 Bain BJ. Blood cells – A practical guide, Wiley Blackwell, London, 5th ed, 2015.  
 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (eds): WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition), IARC, Lyon 2017.

# Akutní promyelocytární leukémie

**Buliková A.**

*Oddělení klinické hematologie, FN Brno*

*Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU, Brno*

Akutní promyelocytární leukémie (APL) jsou skupinou klonálních nádorových onemocnění, které jsou řazeny již řadu let dle WHO klasifikace tumorů hemopoetických a lymfoidních tkání do kategorie akutních myeloidních leukémií (AML) s rekurentní genetickou abnormitou [1]. Celá tato kategorie je charakterizována vznikem fúzního genu kódujícího chimerický protein, který se podílí na leukemogenezi. Je spojena s relativně vyšší frekvencí výskytu u mladších jedinců, relativně vyšší pravděpodobností dosažení kompletní remise po úvodní léčbě a relativně lepší prognózou v řadě případů. Nicméně i zde mohou hrát roli i další přídatné molekulárně-genetické nálezy, které mohou celkový prognostický nálezní ovlivňovat.

Pojem akutní promyelocytární leukémie byl použit poprvé již v roce 1957 [2] na základě morfologického vyhodnocení dřevňového nálezu. Nicméně tento popis je do jisté míry zavádějící, neboť nádorové elementy této leukémie se odlišují od morfologie normálních promyelocytů, která je nyní všeobecně akceptována [3]. Každopádně již první klasifikace akutních myeloidních leukémií, která se opírala výlučně o morfologické a cytochemické nálezy, zařadila APL jako samostatnou kategorii – AML M3 [4]. Krátce nato byla popsána asociace této leukémie s typickou cytogenetickou abnormitou, tj. s reciprokou translokací mezi chromozomy 15 a 17 [5]. Úvodní popis definoval translokaci jako t(15;17)(q22;q21), ale relativně brzy bylo upřesněna současně akceptovaná lokalizace této balancované translokace jako t(15;17)(q24;q21). Trvalo více než desetiletí, nežli byla rozpoznána molekulárně genetická povaha této chromozomální aberace [6]. Spojení genu pro

APL (*PML*) a genu pro receptor alfa kyseliny retinové (*RARA*) dává vznik fúznímu onkogenu *PML-RARA*, transkripční těchto doposud zmlklých genů vzniká protein, který má kritickou roli v buněčné diferenciaci s následkem bloku diferenciaci a expanze myeloidních progenitorů [7], a tudíž se přímo podílí na leukemogenezi.

V průběhu 90. let minulého století se začaly objevovat případy, kdy u morfologicky jasně definovaných případů APL nebyl popsán klasický fúzní gen *PML-RARA*, ale raritně – u méně než 1 % případů [7] – gen *RARA* vstupuje do fúze s jinými geny, než je *PML*. Přehled podává tab. 1. Do současné doby bylo těchto partnerských genů popsáno 15, z nichž fúzní gen *ZBTB16-RARA* (dříve též *ZPLF/RARA*) patří k nejčastějším, zatímco ostatní varianty jsou popisovány vzácně, resp. některé jen v jediném případě [7]. Tyto molekulárně genetické varianty APL byly provázeny i poněkud odchýlnými cytomorfologickými nálezy, což již před více než 20 lety vedlo ke vzniku morfologického klasifikačního systému k odlišení těchto geneticky variantních APL [8]. Tato morfologická analýza může být úsměvná z pohledu současných možností molekulárně genetických vyšetření, nicméně není tak úplně bez významu pro primární morfologickou diagnostiku, na níž spočívá vznik podezření na APL, a to vč. vzácných typů bez *PML-RARA*.

Na leukemogenezi u APL se však nezdá podílet další cytogenetické či molekulárně genetické nálezy; až u jedné třetiny nemocných lze konvenční cytogenetickou analýzou zjistit přídatnou karyotypovou abnormitu, nejčastěji trizomii 8. Na molekulárně genetické úrovni pak zjišťujeme zhruba u třetiny případů mutaci *FLT3*, případně mutaci

genů *WT1* (14 %), *NRAS* (10 %) a *KRAS* (4 %). Tyto nálezy pak mohou ovlivňovat celý průběh choroby a její léčbu [7].

## AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE S *PML-RARA*

Představuje 5–8 % případů AML u mladších jedinců, frekvence výskytu u starších pacientů je relativně méně častá. Může se však objevit v kterémkoli věku a průměrná incidence je v populaci 0,08 případů na 100 000 [1]. Vzácně se může vyskytnout po předchozí cytostatické léčbě či po ozařování jako „therapy-related“ myeloidní neoplázie a pak může mít horší prognózu [1]. Onemocnění je obvykle komplikováno specifickou koagulopatií, která má komplikovanou genezi a klinický i laboratorní obraz má známky diseminované intravaskulární koagulace s hyperfibrinolýzou.

Z morfologického hlediska rozlišujeme dva podtypy; jednak typickou hypergranulární variantu a dále mikrogranulární (hypogranulární) formu.

### Hypergranulární varianta APL

V periferní krvi obvykle není přítomna výraznější leukocytóza, častá je pancytopenie. Vzhledem k závažnosti této diagnózy, zejména nezbytnosti rychlé diagnostiky s ohledem na dobrou prognózu včas léčených případů, by každý případ periferní pancytopenie měl být zvažován jako možná APL. Nádorové elementy APL (viz ještě dále) se mohou v nátěrech periferní krve vyskytovat velice zřídka a je nutné po nich cíleně pátrat. V poslední době se vyskytují zprávy o nových modelech nastavení digitální morfologie (CellaVision), které umožňují rozlišit APL od jiných AML [9], a tím usnadnit cytomorfologické hodnocení, které je jinak v leukopenickém vzorku

**Tab. 1. Variantní geny pro fúzi s RARA při diagnóze APL [upraveno podle 7].**

gen	translokace	funkce, resp. její odchylka	ATRA/ATO účinek
ZBTB16	t(11;17)(q23;q21)	regulace diferenciaci, apoptózy, buněčného cyklu, proliferace	neúčinné oba preparáty
NPM1	t(5;17)(q35;q21)	regulace řady nádorových supresorů, interakce s c-myc ke kontrole syntézy proteinů, biogeneze ribozomů	ATRA citlivé, ATO?
STAT5B	der(17)	buněčná transdukce růstových faktorů, cytokinů a hormonů	neúčinné oba preparáty
IRF2BP2	t(1;17)(q42;q21)	regulace transkripce interferonu typu 1	citlivé oba preparáty
FIP1L1	t(4;17)(q12;q21)	zpracování m-RNA	ARTA citlivé, ATO?
BCOR	t(X;17)(p11;q21)	represe funkce BCL6	ATRA citlivé, ATO ne
NUMA1	t(11;17)(q13;q21)	ovlivňuje mitózu	ATRA citlivé, ATO?
PRKAR1A	t(17;17)(q21;q24) del(17)(q21;q24)	základní komponenta proteinové kinázy typu 1, mediátor signálu cAMP	citlivé oba preparáty
NABP1	t(2;17)(q32;q21)	genomická stabilita, poškození DNA	ATRA citlivé, ATO?
GTF2I	t(7;17)(q11;q21)	role v transkripci, signalizaci růstových faktorů a imunitním systémem	neúčinné oba preparáty
TBLR1	t(3;17)(q26;q21)	aktivace transkripce	ATRA ne, ATO citlivé
FNDC3B	t(3;17)(q26;q21)	možná role v abiogenezi	citlivé oba preparáty
ADAMST17	–	nejasné (zahnut do více chorob)	ATRA citlivé, ATO?
STAT3	der(17)	buněčná transdukce důležitá pro cytokiny	ATRA rezistentní, ATO?
TFG	t(3;14;17) (q12;q11;q21)	funkce endoplasmatického retikula, dysfunkce Golgiho aparátu	ATRA citlivé, ATO?

oranžová – více než 30 případů, růžová – více než 10 případů, modrá – popsán jediný případ

ATRA – kyselina all transretinová, ATO – oxid arzenitý (arsenic trioxide), ? – preparát nebyl v daném případě zkoušen

nesnadné a nezřídka je nutné připravovat preparát z *buffy-coatu*.

Aspirát kostní dřeně je nejčastěji hypercelulární, ale byly popsány i případy APL provázené retikulínovou fibrózou, u nichž mohou být preparáty méně buněčné; hypocelularita je také popisována u případů APL spojené s předchozí cytostatickou léčbou. Nádorové elementy APL jsou označovány jako abnormální promyelocyty, i když v naprosté většině případů nevykazují pro promyelocyty charakteristické projasnění v oblasti Golgiho zóny, které je dohodnutým diferenciacním markerem mezi myeloblasty a promyelocyty jak v normálním nálezu, tak např. v případech myelodysplastického syndromu [3]. Jsou považovány za blastické ekvivalenty, tudíž elementy, které jsou započítávány do pro diagnózu AML nezbytného 20% limitu zastoupení blastů ze všech jaderných buněk dřeně. Nicméně pokud je prokázána typická rekurtní odchylka AML, tak APL podobně jako AML s t(8;21) či AML s t(i(16) tento

limit počtu blastů, resp. jejich ekvivalentů, dle doporučení WHO naplnit nemusí [1]. Nádorové elementy hypergranulární APL jsou velmi variabilní co do tvaru i velikosti i nukleo-cytoplazmatického poměru. Jádra jsou většinou nepravidelná, často ledvinovitá či štěpená, ale mohou být i kulatá či oválná. Každopádně vzhledem k tomu, že cytoplazma těchto buněk je často vyplněna mohutnou azurofilní granulací, nelze obrysy jader většinou vůbec rozpoznat. Granula jsou obvykle větší, než je běžná azurofilní granulace, a objevit se mohou i granula fúzní pseudo-Chediak-Higashiho. Nádorové elementy, které jsou pro APL výlučné, jsou tzv. „faggot cells“. Jde o buňky, které v cytoplasmě obsahují snopce Auerových tyčí, přičemž dle definice [8] by pro tyto APL charakteristické buňky měly mít tyto útvary alespoň tři v jednom elementu. Nicméně v typickém případě Auerovy tyče cytoplazmu zcela vyplňují. Myeloblasty s jednou Auerovou tyčí se jistě u APL mohou také vyskytnout. Tyto patologické cytoplazma-

tické útvary se morfologicky odlišují od Auerových tyčí, které se u AML běžně vyskytují. Jsou větší a na ultrastrukturální úrovni jde o hexagonální aranžmá tubulárních struktur se specifickou periodicitou přibližně 250 nm, zatímco Auerovy tyče jiných AML mají laminární periodicitu o 6–20 nm [1]. U této morfologické varianty se mohou vyskytovat s nižší frekvencí buňky, které se běžně vyskytují u varianty mikrogranulární (viz ještě dále). Ojedinele byla popsána „basofilní“ varianta APL, kdy je u části elementů mohutná cytoplazmatická granulace silně purpurově fialová [8,10], zralé bazofily však přítomny nejsou. Elementy erytropoézy a megakaryocyty mohou být různě početně redukovány v závislosti na míře nádorové infiltrace a s výjimkou případů „therapy related“ APL obvykle nenesou známky myeloidní dysplázie [1,10].

#### Mikrogranulární varianta APL

V periferní krvi je obvykle různě vyjádřená leukocytóza s přítomností četných nádorových elementů. Aspirát kostní

dřeně je obvykle hypercelulární a dominujícími elementy jsou nádorové buňky, které mají nepravidelné tvary jader, často se zářezy, resp. až štěpené formy jader, nebo bilobární jádra spojená jaderným můstkem (popisován je tvar telefonního sluchátka či motýlích křídel). Cytoplazma je obvykle relativně objemná a velmi jemně (prachově) azurofilně granulovaná. Vyskytnout se mohou i elementy blastického vzhledu, kdy jsou jádra kulatá až oválná, cytoplazma vytváří kulaté cytoplazmatické protruze; azurofilní granulace cytoplazmy je přítomna jemná až středně významná, ale nezasahuje do cytoplazmatických protruzí. Nádorové buňky mohou připomínat elementy monocytární řady, nicméně na rozdíl od těchto je zde přítomna silná pozitivita myeloperoxidázy, která může podpořit podezření na tento typ AML. Téměř ve všech případech lze nalézt nečetné elementy charakteristické pro hypergranulární variantu APL [1,10].

Po zahájení léčby kyselinou all-trans-retinovou (ATRA) se můžeme u obou morfologických variant setkat s nálezem Auerových tyčí i vícečetných ve vyzrálších buňkách granulopoézy vč. neutrofilních segmentů, které v tom případě mají často pelgeroidní vzhled jader. Tyto elementy se mohou příležitostně objevit i v čase diagnózy. Při relapsu APL po této medikaci se může objevit specifická morfologická varianta, kdy jsou v hypercelulární kostní dřeni zmnoženy abnormální promyelocyty s objemnou silně basofilní cytoplazmou s relativně bohatou azurofilní granulací; Auerovy tyče mohou být taktéž prokázány [1].

V řadě případů se u téhož nemocného objevují v jistém poměru elementy jak hypergranulární, tak mikrogranulární formy, takže přesné odlišení obou morfologických typů nemusí být úplně jednoduché. Jsou taktéž případy odlišné morfologie v periferní krvi (častěji mikrogranulární) a v kostní dřeni (častěji hypergranulární) u téhož nemocného. Pro další diagnostiku a léčbu však toto rozlišení nemusí být nezbytné, více důležitý je počet leukocytů.

### AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE S ZBTB16-RARA

Patří k nejčastěji se vyskytujícím molekulárně genetickým variantám APL, přičemž literatura dokládá více než 30 případů [7]. Expresí ZBTB16 (dříve PLZF tedy PML gen proteinu „zinc finger“), který je uložen na chromozomu 11q23, je spojena s řadou buněčných procesů, jako jsou diferenciace, apoptóza, buněčný cyklus či proliferace. V souvislosti s tímto genem je popisována suprese a inhibice buněčného cyklu ve fázi G0/G1 [7]. Tento gen je spojen s více nádorovými chorobami jako např. kolorektální karcinom, nádory plic, štítnice, s nádory testikulárními či adenokarcinomem prostaty. ZBTB16 je exprimován na řadě buněk vč. hemopoetických buněk kmenových (hematopoietic stem cell – HSC) a hemopoetických progenitorech. Tato exprese klesá v závislosti s buněčným vyzríváním. Zvýšená exprese genu prodlužuje přežití HSC, což ovlivňuje buněčnou diferenciaci.

Nádorové elementy této leukémie jsou v převaze abnormální promyelocyty, které mají jiný vzhled než buňky klasické hypergranulární APL. Jde o buňky s kulatým či oválným jádrem (někdy označováno jako kulatobuněčná morfologická varianta), cytoplazmou z hojnou azurofilní granulací, která je však méně intenzivní, než je tomu u klasické hypergranulární APL. Auerovy tyče se nemusí vůbec zobrazit. V některých případech je i více vyzrálá struktura jaderného chromatinu, celý dojem tak má „zralejší“ charakter, takže se morfologicky zdá, jako by se vývoj zastavil na úrovni přechodu promyelocytu a myelocytu. Lze nalézt elementy s pseudo-Chediak-Highashiho granulou. Pro tuto variantu je relativně charakteristický výskyt pseudo-Pelgeroidních forem neutrofilů, které se mohou vyskytovat jak v periferní krvi, tak v aspirační biopsii kostní dřeni. Elementy, které se nacházejí u hypergranulární i u mikrogranulární varianty klasické PML-RARA pozitivní APL, se mohou vyskytnout v různém zastoupení [1,7,8,10].

### AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE S NPM1-RARA

Jde o druhou nejčastěji referovanou genetickou variantu APL, kdy bylo v literatuře popsáno více než 10 případů. Do fuze nového onkogenu zde vstupuje gen pro nukleofosmin (NPM1) lokalizovaný na chromozomu 5q35. NPM1 hraje roli v regulační aktivitě řady nádorových supresorových genů (MDM2, p53, ARF), zasahuje do biogeneze ribozomů, resp. cestou přímé interakce s c-myc zasahuje do syntézy proteinů [7]. Alterace či mutace genu NPM1 je popsána u řady onkologických chorob, vč. kolorektálního karcinomu, nemalobuněčného tumoru plic, či různých typů AML. Morfologie této leukémie je nevyhraněná a mohou být zastoupeny elementy všech předchozích typů vč. hypergranulárních elementů s nepravidelným či konvolutovaným jádrem vč. faggot cells, ale i relativně často elementy mikrogranulární APL, či formy s pseudo-Chediak-Highashiho granulou, případně pelgeroidní elementy [8].

### AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE S STAT5B-RARA

Jde o další genetickou variantu APL, která byla referována v literatuře ve více než 10 případech [7]. Signální transduktory a aktivátory transkripce (STATs) jsou latentní cytosolické transkripční faktory, které jsou aktivovány Janusovými tyrosinovými kinázami a jsou zapojeny do buněčné transdukce růstových faktorů a působení různých cytokinů či hormonů. Mutace STAT byly popsány u řady endokrinních chorob a nádorových onemocnění vč. myeloidních neoplázií [7]. Fúzní protein STAT5B-RARA má za následek blokádu myeloidní diferenciace. Většina popsaných pacientů byla ve spíše mladším věku (10–60 let); pacienti měli typické příznaky APL asociované koagulopatie a klasickou APL morfologii (hypergranulární či mikrogranulární).

Ostatní případy variantních APL lze obtížně popsat, neboť jde o jednotky případů v literatuře. Více z těchto popsaných

případů bylo asociováno z charakteristikou koagulopatií, nicméně ne všechny [7].

## ZÁVĚR

Cytologická morfologie má pro diagnostiku APL zásadní význam, neboť na základě podezření vznikajícího z mikroskopického nálezu po zhodnocení klinického stavu pacienta, koagulace, nálezu imunofenotypizačního, je indikováno časné molekulárně-genetické vyšetření, které diagnózu potvrdí. V řadě případů lze diagnózu stanovit již na základě mikroskopického vyšetření periferní krve. Vzácné případy APL mohou být provázány jinou molekulárně-genetickou odchylkou, než je PML-RARA a na tyto případy je nutno pamatovat za okolností, že je klinický a morfologický nález suspektní a standardní PCR negativní. Řada případů může být léčena stejně jako klasická APL a rozšířené molekula-

árně genetické testování je proto jednoznačně indikováno při typickém či méně typickém morfologickém nálezu APL.

## Grantová podpora

Práce byla podpořena MZ ČR – RVO (FNBr – 65269705).

## Literatura

1. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, et al (eds). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). IARC Lyon 2017:1–585.
2. Hillestad LK. Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med Scand.* 1957;159:189–195.
3. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International working group on morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Hematologica* 2008;93:1712–1717.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias (FAB Co-operative Group). *Br J Haematol* 1976;33:451–458.

5. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia. *Lancet* 1977;1:549–550.
6. de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, et al. The t (15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990;347:558–561.
7. Mannan A, Muhsen IN, Barragán E, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of acute promyelocytic leukemia translocation variants. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2020;13:189–201.
8. Sainy D, Liso V, Cantu-Rajoldi A, et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. *Blood.* 2000;96:1287–1296.
9. Sindhom JW, Siddharthan IJ, Lai BS, et al. Deep learning for diagnosis of acute promyelocytic leukemia via recognition of genomically imprinted morphologic features. *Precision Oncology.* 2021;5:38. doi: 10.1038/s41698-021-00179-y.
10. Invernizzi R. Acute myeloid leukemia and related precursor neoplasms. In: Balduini (ed). *Haematologica atlas of hematologic cytology.* *Haematologica* 2020;105(Supplement no 1):98–119.

# Diferenciální diagnostika akutních lymfoblastových leukémií

Souček O.<sup>1</sup>, Šimečková R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav klinické imunologie a alergologie, FN Hradec Králové

<sup>2</sup> Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Do skupiny akutních lymfoblastových leukémií patří prekurzorové B a T lymfoblastové leukémie / lymfomy (B-ALL/LBL, T-ALL/LBL). Upozornit na přítomnost tohoto onemocnění může patologie krevního obrazu a typický morfologický nález.

V periferní krvi jsou anémie a trombocytopenie různého stupně, leukocytóza s neutropenií a lymfocytózou. Výjimkou nejsou ani normální hodnoty krevního obrazu a lymfocytóza nebo pancytopenie, v nátěru periferní krve jsou přítomny lymfoblasty.

Starší morfologická klasifikace FAB rozdělila ALL na L1, kde převažují malé blasty s vysokým N/C poměrem, jádro je pravidelné s jemným homogenním chromatinem a nenápadným jádrem, v menších blastech může být chromatin více kondenzovaný. U ALL typu L2 jsou

blasty větší a více heterogenní, jádro bývá nepravidelné a jádro zřetelné. U ALL L3, která odpovídá zralé Burkittově leukémii / lymfomu, jsou blasty opět více homogenní, tvar jádra bývá pravidelný, chromatin je retikulární s jedním i více jádérky. Cytoplazma je nápadně bazofilní s vakuolami, časté jsou mitotické figury a apoptotické buňky.

Cytochemické vyšetření je nespecifické. Lymfoblasty jsou v myeloperoxidáze (MPO) a v barvení sudanovou černí (SBB) negativní. V případě lymfoblastů z B linie je častá hrubě granulární až bloková pozitivita v PAS reakci (periodic acid-Schiff). U lymfoblastů z T linie je častá fokální pozitivita v kyselé fosfatáze.

Pro diagnostiku má zásadní význam vyšetření průtokovou cytometrií, které poskytuje rychlé určení liniové příslušnosti

leukemické populace pomocí analýzy exprese povrchových a cytoplazmatických antigenů. Průtoková cytometrie dále napomáhá bližšímu rozlišení jednotlivých podtypů leukémií dle WHO či EGIL klasifikace. Velký přínos průtokové cytometrie je v detekci LAIP (s leukémií asociovaném fenotypu), která umožňuje následné sledování minimální reziduální choroby při léčbě. I přes nesporné výhody má průtoková cytometrie ve svých interpretačních možnostech limity, které však vhodně doplňují vyšetření morfologická, histopatologická, genetická a další. Zejména úzká spolupráce mezi cytometristou a morfologem je důležitá pro objektivní posouzení a interpretaci nálezu.

Ve sdělení budou prezentovány typické morfologické a cytometrické nálezy B-ALL, T-ALL a bcr/abl pozitivní ALL.

## Diferenciální diagnostika pancytopenií – kazuistiky

Zuchnická J.<sup>1</sup>, Brillantová M.<sup>2</sup>, Hájek R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Klinika hematologické onkologie, LF OU a FN Ostrava*

<sup>2</sup> *Ústav laboratorní medicíny, Oddělení klinické hematologie, FN Ostrava*

Jako pancytopenii označujeme stav, kdy je v obvodové krvi snížen počet všech typů krevních buněk pod referenční mez pro daný věk a pohlaví. Nemocný má anémii, trombocytopenii a leukopenii různého stupně s různými klinickými projevy.

Pancytopenie je důsledkem porušené tvorby krvinek v kostní dřeni z různých příčin. Často se jedná o infiltraci kostní dřene nádorem (akutní leukémie, lymfomy, metastazující tumory), pancytopenie může být způsobena selháním kostní dřene (toxické vlivy, medikace,

aplastická anémie, myelodysplastický syndrom, paroxysmální noční hemoglobinurie) nebo nedostatkem stavebních látek (vitamin B<sub>12</sub>, foláty). Příčinou pancytopenie může být i destrukce krevních buněk v periferní krvi (hypersplenismus, DIC), závažná infekce, sepse, autoimunitní choroby.

Pro objasnění příčiny pancytopenie je nutné pečlivé vyšetření nátěru periferní krve a kompletní vyšetření kostní dřene (cytologie, cytochemie, imunofenotypizace, cytogenetika a histologické vyšetření). Přesné stanovení diagnózy

je podmínkou pro správný způsob léčby.

Cytomorfologické vyšetření nátěrů periferní krve a kostní dřene hraje v diagnostice pancytopenií nadále důležitou roli. Je prvním a nejrychleji dostupným laboratorním nálezem.

Ve svém sdělení prezentuji cytomorfologické nálezy u několika nemocných s pancytopenií, které jsou zajímavé z morfologického a klinického hlediska. Morfologický nález je u všech případů doplněn o závěry ostatních navazujících laboratorních metod.

## Point-of-care metody v koagulaci

Mikešová M., Pulcer M.

Testování v místě péče o pacienta je rychle se rozvíjející způsob vyšetření různých parametrů potřebných pro rychlou diagnostiku. Vzhledem k dynamickému rozvoji těchto metod je „point of care“ testování předmětem řady diskusí napříč odbornostmi. POCT přístroje často používají pracovníci s žádnou nebo minimální laboratorní praxí, nemají jasné povědomí o principu testu, jeho omezeních, neznají základní principy kontroly kvality. Z tohoto důvodu vznikla nutnost zavedení základních pravidel pro správné používání těchto přístrojů. Tato pravidla jsou shrnuta v řadě národních i mezinárodních doporučení, jejich aplikace je v současné době kontrolována hlavními akreditačními orgány nemocnic i laboratoří.

Nejdůležitějšími požadavky jsou:

- v klinické praxi by měly být používány přístroje vhodné pro zamýšlený účel použití (problém používání přístrojů pro *selftesting*, či pro veterinární účely);
- nastavení odpovědností všech zúčastněných zaměstnanců, jejich jasná identifikace;
- výkon by měl provádět pouze vyškolený a plně kompetentní personál;
- data/záznamy o měření vzorku pacienta by měly být udržovány a uchovávány v souladu s platnou legislativou;
- měly by být dodrženy požadavky preanalytické fáze pro dané vyšetření;
- zavedený postup pro IKK a EHK;
- supervizor musí nastavit mechanismy pro zajištění řízení kvality (interní a externí audit), vč. politiky řízení rizik;
- na místě by měl existovat jasný výstižný dokument pro interpretaci výsledků, reflexní testování a doporučení, v jakých případech je nutné přetestování v centrální nebo satelitní laboratoři.

Většina doporučení se shoduje, že POCT přístroje by neměly být používány jako náhrada za konvenční laboratorní testování, ale spíše k jeho doplnění. Klinická užitečnost je malá, pokud není zaručena kvalita konečného výsledku.

Sdělení analyzuje POCT problematiku v koagulaci. Přednášející představí aktuální přehled přístrojů používaných v oblasti hemostázy. Budou se zabývat nejen požadavky platné legislativy, ale jejich plněním a úskalími spojenými s realizací. Budou diskuto-

vat témata návaznosti těchto přístrojů a porovnání s laboratorními testy. Autoři v rámci sdělení chtějí referovat o svých zkušenostech s aplikací laboratorní supervize v praxi. Cílem bude také upozornit na možné chyby spojené s neodborným používáním těchto přístrojů. V přednášce budou představeny také možnosti SW supervize pro laboratorní personál a propojení POCT přístrojů do informačních a komunikačních technologií pro poskytování zdravotních služeb na dálku. Závěrem autoři shrnou důvody nutnosti zapojení pracovníků laboratoří v supervizi nad těmito přístroji, tak aby výhody POCT zvyšovaly kvalitu péče o pacienta.

### Literatura

Doporučení pro správné zavedení a používání POCT přístrojů měřící hematologické parametry  
Zpracoval: M. Pulcer, D. Mikulenková, L. Slavík, M. Mikešová, P. Bradáčová, M. Kavanová, P. Šigutová, I. Malíková, J. Kurková ze dne 20. 3. 2020.  
Česká technická norma ČSN EN ISO 22870:2017: Vyšetření u pacienta (VUP) – Požadavky na kvalitu a způsobilost, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, verze: 2, platnost od 01. 07. 2017.  
Česká technická norma ČSN EN ISO 15189:2013: Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na kvalitu, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, 2013.

## Interference léčby s laboratorním vyšetřením koagulace: přímé inhibitory koagulace

Malíková I., Husáková M., Kvasnička J.

ÚLBDL Centrální hematologické laboratoře a Trombotické centrum VFN v Praze

**Klíčová slova:** účinná inhibice – koagulace – přímé inhibitory koagulace – tablety DOAC stop

Při podávání antikoagulační léčby je hemostatický systém ovlivněn různým způsobem závislým na druhu použitého antikoagulantia, kdy při užití přímých inhibitorů koagulace (DOAC) dochází k velmi specifickým změnám.

Přímé inhibitory koagulace můžeme rozdělit na dvě skupiny:

- a) přímé inhibitory aktivovaného faktoru X (FXa) – rivaroxaban, apixaban a edoxaban;
- b) přímé inhibitory trombinu (FIIa) – dabigatran etexilát, argatroban, hirudin.

Přímé inhibitory FXa mají rychlý nástup účinku (30–60 min) s maximálním účinkem za 2–4 hodiny po požití tablety [1,2]. Účinkem na úrovni působení faktoru Xa (FXa) na přeměnu protrombinu na trombin regulují množství vznikajícího trombinu. Z principu svého působení mohou tedy ovlivnit zejména výsledky testů inhibice FXa. Ty jsou dnes v praxi používány ke sledování antikoagulační účinnosti nízkomolekulárních heparinů nebo nefrakcionovaného heparinu. Pokud se ale použijí tyto testy, je třeba upozornit na to, že získané výsledky inhibice FXa odpovídají kalibraci těchto testů na nízkomolekulární heparin (hodnoty jsou v IU/ml) a k ověřování inhibičního účinku přímých inhibitorů FXa nejsou příliš vhodné. Mohou sloužit jako orientační test, jestli pacient léčbu užívá. Podle doporučení ISTH (Mezinárodní společnost pro trombózu a hemostázu a její komise pro standardizaci) [3] je sledování inhibičního účinku přímých inhibitorů FXa vhodné provádět metodou nakalibrovanou na rivaroxaban, apixaban a edoxaban.

Přímý inhibitor trombinu dabigatran se užívá ve formě proléčiva-dabigatran etexilát, které je až v organizmu esterázami metabolizováno na aktivní substanci dabigatran. Tato substance má rychlý nástup účinku (30 min) s maximem účinku za 0,5–2 hodiny [4].

Přibližný údaj o intenzitě antikoagulačního účinku dabigatranu poskytuje test aPTT, který je snadno dostupný. Trombinový test (čas) je na přítomnost léku velmi citlivý, proto se extrémně prodlužuje i při minimální hladině léku. Může však sloužit jako orientační test, jestli pacient léčbu užívá.

Test aPTT má omezenou citlivost a není vhodný pro přesné stanovení antikoagulačního účinku, zvláště při vysokých plazmatických koncentracích dabigatranu. V případě potřeby by tedy měly být provedeny citlivější kvantitativní testy, jako je kalibrovaný ředěný (dilutovaný) trombinový test [5] nebo chromogenní test na principu inhibice nadbytku trombinu a následného uvolnění p-nitroanilinu ze substrátu působením zbytkového trombinu. Oběma uvedenými testy lze sledovat i antikoagulační účinek hirudinu a argatrobanu, pokud je na jednotlivé preparáty metoda nakalibrována. Ecarinový test, doporučovaný pro sledování účinku dabigatranu, není v naší republice běžně prováděn.

Ovlivnění prováděných laboratorních vyšetření při podávání DOAC se liší podle použitých metod. Nejvíce jsou ovlivněny metody závislé na vzniku koagula, méně jsou pak ovlivněny metody chromogenní. Metody imunologické (příkaz antigenu, protilátek) by měly být

bez ovlivnění. Obecně ale DOAC mohou ovlivnit jak vyšetření na krvácivý stav, tak vyšetření trombofilního stavu.

Důležitou roli hraje čas podání léku, protože DOAC mají relativně krátký poločas. Pokud chceme vyšetřovat koagulační parametry s minimálním ovlivněním, je vhodné provést odběr v domě minimálního účinku, tj. přibližně půl hodiny před podáním tablety. Pokud bychom naopak chtěli ověřit účinnost inhibice koagulace, je vhodné směřovat odběr na dobu maximálního účinku léku.

Pokud chceme spolehlivě vyšetřit parametry hemostázy bez ovlivnění, doporučuje se použití DOACs stop tablet, které in vitro ruší vliv přímých inhibitorů koagulace [6].

Významně jsou ovlivněny testy na průkaz Lupus antikoagulantů (falešná pozitivita), koagulační stanovení proteinu C a S, průkaz APC rezistence, je ovlivněno stanovení koagulačních faktorů pomocí faktor deficitních plazem (zejména faktor VIII). U vyšetření generace trombinu jsou výrazně sníženy peak trombinu i endogenní trombinový potenciál, což odpovídá cílům působení.

Při celkovém posouzení trombofilního i krvácivého stavu je potřeba toto ovlivnění brát v úvahu. Použitím DOACs stop tablet můžeme odlišit skutečné onemocnění od falešné positivity způsobené vlivem léků.

### Literatura

1. Souhrn údajů o přípravku Xarelto. [online]. [cit. 2013-12-18]. Dostupný na WWW: [http://www.emea.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000944/WC500057108.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000944/WC500057108.pdf).



2. Souhrn údajů o přípravku Eliquis. [online]. [cit. 2013-12-18]. Dostupný na WWW: [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002148/WC500107728.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002148/WC500107728.pdf).

3. Baglin T, Hillarp A, Tripodi A, et al. Measuring Oral Direct Inhibitors (ODIs) of thrombin and factor Xa: A recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardisation Committee of the

International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2013;11:756–760.

4. Souhrn údajů o přípravku Pradaxa. [online]. [cit. 2013-12-18]. Dostupný na WWW: [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000829/WC500041059.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf).

5. Kvasnička J, Penka M, Kvasnička T et al. Doporučení České společnosti pro trombozu a hemostazu České lékařské společnosti J. E. Pur-

kyně pro bezpečnou léčbu novými perorálními antikoagulanty (NOAC) – dabigatran etexilatem, apixabanem a rivaroxabanem. *Vnitř Lek* 2015;61(6):537–546.

6. Baker SA, Jin J, Pfaffroth C, Vu T, Zehnder JL. DOAC-Stop in lupus anticoagulant testing: Direct oral anticoagulant interference removed in most samples *Res Pract Thromb Haemost*. 2021;5(2):314–325. doi: 10.1002/rth2.12472.

## Interference léčby s laboratorním vyšetřením koagulace: Moderní léčba hemofilie

Hrachovinová I.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Laboratorní vyšetření koagulace je založeno na fyziologických dějích, které sledují funkčnost srážení plazmy, případně celé krve. Na tomto principu jsou založené skríninkové testy APTT, PT, TT, PFA aj. Léčba většiny koagulopatií je založena na ovlivnění patologické hemostázy. Je proto přirozené, že běžné skríninkové testy mohou být léčbou ovlivněny. Ale je nutné tuto interferenci znát, protože špatně vyhodnocené výsledky koagulace mohou mít pro pacienta i fatální následky.

Zaváděním nových a modernějších léčiv, které interferují s laboratorním vyšetřením hemostázy, klade na laboratoře nové požadavky – zavádění nových metod a prosazování starých pravidel, protože je nutná znalost léčby vyšetřovaného pacienta. To je informace, která se vždy podceňovala. Dlouhá desetiletí jsme bojovali pouze s dohledáváním informací o heparinových a dikumarolových antikoagulantech. Bohužel v posledním desetiletí výrazně přibýlo léků, které interferují nejen s výsledky skríninkových, ale i speciálních metod koagulace. Jsou to především **moderní antikoagulantia** („noaky“) a **moderní léky hemofilie**.

### MODERNÍ LÉČBA HEMOFILIE

Léčba hemofilie A i B se stále zdokonaluje. Výrazným posunem k lepší péči

o hemofilické pacienty je zavádění léků s prodlouženým poločasem (*extended half-life* – EHL) a také léků nefaktorových, které nejsou na principu FVIII nebo FIX (emicizimab, fitusiran, concizumab) a upravují hypo-koagulaci hemofilických pacientů směrem k normální koagulaci.

Podávání léčby u hemofiliků se nastává a monitoruje metodou stanovení aktivity FVIII/FIX. Tato metoda je buď na principu koagulačním (jednofázová metoda) nebo chromogenním. Koagulační metoda využívá APTT reagentie, které se liší různými aktivátory (upravené křemičitany, ellagovou kyselinu nebo kaolin aj.) a FVIII deficitní plazmu, chromogenní metoda je založená na směsi purifikovaných faktorů (X, IXa), fosfolipidů a trombinu. Výsledkem reakce je FXa, který hydrolyzuje syntetický barevný substrát.

Obě metody dávají souhlasné výsledky při vyšetřování aktivity podaných neupravených plazmatických koncentrátů FVIII/FIX (tab. 1, 2). Koncem 90. let byly uvedeny na trh rekombinantní FVIII s deletovanou B doménou, to mělo za následek diskrepantní výsledky mezi chromogenní a koagulační metodou. ISTH vydala doporučení měřit léčebnou hladinu FVIII chromogenní metodou.

### MONITOROVÁNÍ EHL KONCENTRÁTŮ FVIII/IX

Většina EHL léků, které jsou na trhu, dávají diskrepantní výsledky vyšetření FVIII/FIX, proto bylo na základě mnoha mezinárodních studií a EKK šetření sepsáno několik doporučení, jak vyšetřovat aktivitu podaných koncentrátů.

### MONITOROVÁNÍ NEFAKTOROVÉ LÉČBY HEMOFILIE

**Emicizumab** (HEMLIBRA®, Roche) je rekombinantní humanizovaná bispecifická monoklonální protilátka imunoglobulinu G4 (IgG4), která propojuje aktivovaný faktor IX (FIXa) s faktorem X (FX), čímž nahrazuje část kofaktorové funkce aktivovaného faktoru VIII (FVIIIa) a obnovuje hemostázu.

Emicizumab ke svému kofaktorovému působení na rozdíl od FVIII nepotřebuje aktivaci. Má přímý účinek na laboratorní koagulační testy na bázi vnitřní cesty koagulace, normalizuje APTT, i když aktivita emicizumabu není ještě ve správném terapeutickém rozmezí.

Aktivita emicizumabu se měří koagulační metodou jako FVIII s obměnami (vyšší ředění patientského vzorku, jiný kalibrátor). Zásadní změna je při měření inhibitoru FVIII a zbytkové hodnoty

**Tab. 1. Seznam FVIII koncentrátů a doporučené metodiky stanovení podle (Gray E. a Jeanpierre E.).**

Jméno	INN	Výrobce	Doporučené reagencie	Nedoporučené reagencie
Elocta	Efmoroctocog alfa	Swedish Orphan Biovitrum	Actin FS, Actin FSL, Auto APTT, Cephascreen, CK Prest, Pathromtin SL, SynthASil, chromogenní metody	–
N8-GP	Turoctocog alfa pegol	Novo Nordisk	Actin, Actin FS, Pathromtin SL, SynthAFax, DG Synth, chromogenní metody	APTT-SP
Jivi	Damoctocog alfa pegol	Bayer AG	Actin FSL, Pathromtin SL, SynthASil, chromogenní metody	Actin FS, CK Prest, APTT-S, PTT-A
Afstyla	Lonoctocog alfa	CSL Behring	Chromogenní metody pouze	Všechny koagulační
Adynovi	Rurioctocog alfa pegol	Takeda	–	–

INN – *international nonproprietary name***Tab. 2. Seznam FIX koncentrátů a doporučené metodiky stanovení podle (Gray E. a Jeanpierre E.).**

Jméno	INN	Výrobce	Doporučené reagencie	Nedoporučené reagencie
Alprolix	Eftrenonacog alfa	Swedish Orphan Biovitrum	Actin, Actin FS, Actin FSL, Pathromtin SL, Cephascreen, SynthASil, Chromogenní jen Rossix	CK Prest a jiné kaolinové aktivátory
Idelvion	Albutrepenonacog alfa	CSL Behring	Pathromtin SL, SynthASil	CK Prest, SynthAFax Actin FS, chromogenní metody
Refixia	Nonacog beta pegol	Novo Nordisk	SynthAFax, DG Synth, Cephascreen, Chromogenní metody	APTT-SP, Actin, ActinFS, ActinFSL, SynthASil, Pathromtin SL

INN – *international nonproprietary name***Tab. 3. Výsledky ovlivněné/neovlivněné přítomností emicizumabu.**

Výsledky ovlivněné emicizumabem	Výsledky neovlivněné emicizumabem
Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)	Vyšetření Bethesda (bovinní chromogenní) ke stanovení titrů inhibitorů FVIII
Vyšetření Bethesda (koagulační) ke stanovení titrů inhibitorů FVIII	Trombinový čas (TT)
Jednostupňová jednofázová vyšetření na principu aPTT	Jednostupňová jednofázová vyšetření na principu protrombinového času (PT)
Vyšetření rezistence na aktivovaný protein C na bázi aPTT (APC-R)	Chromogenní jednofázová vyšetření kromě testů FVIII, IX
Aktivovaný koagulační čas (ACT)	Imunitní vyšetření (např. ELISA, turbidimetrické metody-DDim)
	Genetické testy koagulačních faktorů (např. FV Leiden, Prothrombin 20210)

vlastního nebo dodaného FVIII u pacienta v léčbě emicizumabem. K měření inhibitoru i zbytkového FVIII se využívá chromogenní kit na vyšetření FVIII, ALE reagencie musí být nehumánního původu (např. bovinní), protože na nehumánní reagencie se emicizumab neváže.

Emicizumab ovlivňuje výsledky běžných i speciálních metodik, jejich výčet je v tab. 3.

**Fitusiran((ALN-AT3SC, Sanofi)** potlačuje expresi antitrombinu (AT) v játrech, tím snižuje množství AT v plazmě a zasahuje do přirozené antikoagulační cesty. Předpokládá se snížená aktivita AT. Na zvířecích modelech a při použití nanotechnologií bylo zjištěno, že snížení AT na 30 % odpovídá u těžké hemofilie A 20 % FVIII. Zatím není dostatek informací o monitorování ani interferencích fitusiranu.

**Concsumab (mAb2021, NovoNordisk)** je protilátka, která neutralizuje inhibiční aktivitu TFPI k FXa. Její přítomnost umožňuje delší funkci komplexu TF/FVIIa, a tím stimuluje vyšší generaci trombinu. Měření přítomnosti protilátek proti TFPI a jejich inhibiční funkce je komplikované, protože v plazmě se vyskytuje jen 10–30 % TFPI. Je možné využít nepřímou metodu měření pomocí trombin ge-

neračního času. Přítomnost anti-TFPI zvyšuje endogenní trombinový potenciál. Zatím není dostatek informací o monitorování ani interferencích concisumabu.

### Literatura

Lusher JM, Hillman-Wiseman C, Hurst D. In vivo recovery with products of very high purity – assay discrepancies. *Haemophilia*. 1998;4:641–645.  
Jeanpierre E, Pouplard C, Lasne D, et al. On behalf of the French Study Group on the Biology of

Hemorrhagic Diseases (the BIMHO group). Factor VIII and IX assays for post-infusion monitoring in hemophilia patients: Guidelines from the French BIMHO group (GFHT). *Eur J Haematol*. 2020;105:103–115.

Gray E, Kitchen S, Bowyer A, et al. Laboratory measurement of factor replacement therapies in the treatment of congenital haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia*. 2020;26:6–16.  
Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, et al. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Cen-

tre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia*. 2020;26:151–155.

Lenting PJ. Laboratory monitoring of hemophilia A. *Blood Advances*. 2020;4(9):211–2118.

Barbon E, Ayme G, Mohamadi A, et al. Single-domain antibodies targeting antithrombin reduce bleeding in hemophilic mice with or without inhibitors. *EMBO Mol Med*. 2020;12(4):e11298.

Hilden I, Lauritzen B, Sørensen BB, et al. Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model. *Blood*. 2012;119(24):5871–5878.

## Preanalytická fáze vyšetřování hemostázy

### Šigutová P.

Ústav klinické biochemie a hematologie, FN Plzeň

Laboratorní sekce České hematologické společnosti připravila v roce 2021 pro odbornou veřejnost doporučení týkající se preanalytické fáze hematologických vyšetření, které se zabývá jak preanalytikou před příjmem vzorku do laboratoře, tak preanalytickými procesy v laboratoři. Chyby v preanalytické fázi představují až 70 % všech laboratorních chyb, často se projeví až v analytické či postanalytické fázi vyšetření. Edukační sdělení komentuje nejdůležitější body publikovaného doporučení v oblasti vyšetřování primární hemostázy a hemokoagulace. Předpokládá se dodržení obecných požadavků aktuální verze normy ISO 15189, které se týkají informací pro pacienty a uživatele, přípravy pacienta k odběru, práce se žádankami, ověření identity pacienta před odběrem, popis odběrového systému, kritéria pro odmítnutí vzorků atd.

### ODBĚR KRVE PRO VYŠETŘENÍ HEMOSTÁZY

- Žilní krev pro koagulační vyšetření se odebírá do zkumavek, které obsahují jako antikoagulans pufrovaný 106–109 mmol/l citrát sodný (odpovídá 3,2% citrátu sodnému) pokud není uvedeno jinak.

- Bezprostředně po odběru je potřeba zkumavku několikrát (3–4× nebo podle doporučení výrobce zkumavek) jemně převrátit.
- Při odběru žilní krve do více zkumavek by měla být zkumavka pro koagulační vyšetření s 3,2% citrátem sodným druhá v pořadí. Požaduje-li se vyšetřit pouze protrombinový test ze žilní krve, je přípustné, aby tato zkumavka byla jediná.
- Zaškrcení paže turniketem (škrtdílem) při odběru krve pro koagulační testy nesmí být delší než 2 min.
- Ideální průměr odběrové jehly pro koagulační testy je 19–21 gauge pro dospělé s dobrým žilním přístupem; pro ostatní a děti se doporučuje 22–23 gauge,
- Je nutné dodržet přesné naplnění zkumavky, tj. požadovaný poměr antikoagulans a krve (1 : 9 znamená 1 díl citrátu a 9 dílů krve). Tolerance odchylky je  $\pm 10\%$ .
- U pacienta s hematokritem  $> 0,55$  je potřeba před odběrem upravit množství citrátu v odběrové zkumavce pro zachování standardní cílové koncentrace v plazmě. Množství antikoagulancia se upravuje podle vzorce:

$$V_{\text{citrátu}} = [1,85 \times 10^{-3}] \times [100 - \text{Hct} (\%)] \times [V_{\text{kve}} (\text{ml})].$$

**Transport vzorků** do laboratoře musí být při teplotě  $+15$  až  $+25$  °C. Doba transportu nesmí trvat déle než 1–2 hodiny; u pacientů léčených heparinem musí být primární vzorek dodán do 1 hodiny od odběru.

**Skladování vzorků citrátové krve** před vyšetřením nebo zpracováním musí být při teplotě  $+15$  až  $+25$  °C.

Vyšetření hemostázy se provádí:

- **z plné krve** (PFA, ROTEM, TEG, Multiplate, ACT); krev musí být vyšetřena dle doporučení výrobce zkumavek (zpravidla 1–2 hodiny od odběru);
- **z plazmy získané z citrátové krve** (většina koagulačních vyšetření).

### PŘÍPRAVA PLAZMY

Plazma se připravuje centrifugací vzorku plné krve. Separaci plazmy pro koagulační vyšetření nutno provést do 2 hodin od odběru; získaná plazma má být zpracována (vyšetřena, popř. šokově zamrazena) nejdéle do 4 hodin od odběru (výjimka je odběr na FVIII nebo PT).

- Plazma bohatá na destičky (*platelet-rich plasma* – PRP) se připravuje cent-

rifugací citrátové krve při 200–250 g po dobu 5–10 min a bez použití brzdy. Testování musí proběhnout do 2 hodin od odběru krve a suspenzi destiček nelze skladovat (zamrazit).

- Plazma chudá na destičky (*platelet-poor plasma* – PPP) – centrifugace primárních vzorků při 2 000–2 500 g je 15 min. Po centrifugaci může zůstat plazma s buňkami do doby analýzy i při analýze v uzavřených primárních zkumavkách nebo může být přenesena do další zkumavky (plast, silikonované sklo) bez porušení buffy coatu. Při přenosu je potřeba dbát na to, aby byla zachována návaznost na primární vzorek.
- Bezdestičková plazma (*platelet-free plasma* – PFP, s počtem trombocytů  $< 10 \times 10^9/l$ ) – centrifugace 2× jako PPP. PFP je nezbytná pro vyšetření lupus antikoagulans a pro dlouhodobé uchování zamražené plazmy. Plazma se následně rozpipetuje do mikrozku-mavek, šokově zamrazí (na teplotu nižší než  $-70^\circ\text{C}$ ).

## STABILITA VZORKŮ PRO VYŠETŘENÍ KOAGULACE

- Protrombinový test (PT) – stabilita primárního vzorku a plazmy je 6 hodin; teplota skladování nesmí klesnout pod  $+15^\circ\text{C}$ , při ochlazení se aktivuje FVII a dochází ke zkrácení času PT.
- APTT – stabilita primárního vzorku i plazmy bez heparinu je 4 hodiny od odběru.
- Vzorek s nefrakcionovaným heparinem se musí centrifugovat do 1 hodiny po odběru. Není-li na žádance uveden druh antikoagulační léčby, laboratoř posuzuje stabilitu vzorku, jako by byl pacient heparinizován.
- FVIII – stabilita primárního vzorku i plazmy je 2 hodiny od odběru.
- Pro ostatní koagulační stanovení (trombinový test, fibrinogen, protein C, FV atd.) je stabilita vzorku 4 hodiny od odběru.

## CENTRIFUGACE

K oddělování plazmy od ostatních buňčných komponent je nutno používat

validované centrifugy s výkyvným roto-rem, centrifugace by měla probíhat za teploty  $+15$  až  $+25^\circ\text{C}$ .

## SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

Zmražená plazma se skladuje při teplotě nižší než  $-70^\circ\text{C}$  po dobu 1 roku, při teplotě  $-20^\circ\text{C}$  pouze 2 týdny. Před vyšetřením se plazma rozmrazí 5–10 min při teplotě  $+37^\circ\text{C}$  ve vodní lázni a šetrně se v ruce promíchá. Plazma se nesmí rozmrazovat při teplotě  $+15$  až  $+25^\circ\text{C}$ ; rozmražená plazma se nesmí znovu zmrazit!

Skladování vzorků plné krve se nedoporučuje; nevhodné skladování v chladu ( $+2$  až  $+8^\circ\text{C}$ ) může způsobit aktivaci krevních destiček, aktivaci FVII, pokles aktivity vWF a FVIII, a může vést k falešnému podezření na diagnózu hemofilie A nebo von Willebrandovy choroby.

Skladování čerstvé plazmy se nedoporučuje; skladování při teplotě  $+15$  až  $+25^\circ\text{C}$  je možné pouze po dobu stability vyšetřovaných parametrů.

# Diagnostika lupus antikoagulans

Zavřelová J.  
FN Brno

Lupus antikoagulans (LA) je skupina antifosfolipidových protilátek, které jsou diagnostikovány na základě jejich schopností ovlivňovat na fosfolipidech závislé reakce krevního srážení *in vitro*. Jedná se o heterogenní skupinu protilátek namířených proti plazmatickým proteinům vázajícím fosfolipidy (PL) s různými klinickými komplikacemi u jednotlivých pacientů a antigenními cíli, odlišným patogenetickým mechanismem, ale i různými laboratorními výsledky. Průkaz LA je součástí komplexního vyšetření antifosfolipidových protilátek (APA) a diagnostiky antifosfolipidového syndromu (APS).

Laboratorní diagnostika LA je komplikovaná, protože neexistuje test 100%

citlivý jen na LA. K prodloužení testů závislých na fosfolipidech dochází i v případě jiných koagulopatií a léčby. Diagnostika LA dle doporučení Laboratorní sekce ČHS ČLS JEP „Diagnostika LA“, vypracovaného na podkladě mezinárodních doporučení SSC ISTH 2009, BCSSH 2012 a CLSI 2014, zahrnuje několik kroků: průkaz prodloužení testů závislých na fosfolipidech (screening), průkaz inhibitoru (korekční testy) a průkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru (konfirmasi). Nedílnou součástí diagnostiky LA je vyloučení jiných koagulopatií a ovlivnění antitrombotickou léčbou.

Důležitým předpokladem správné diagnostiky LA je standardizace vyšet-

ření LA dle doporučení, která zahrnuje dodržení preanalytických podmínek, správnou volbu testů, pořadí testů, vyšetřování směsné normální plazmy, nastavení vlastních cut-off, provedení kontrol kvality, správné vyhodnocení testů a interpretace výsledků LA.

K vyšetření LA musí být použita bezdestičková plazma (počet trombocytů  $< 10 \times 10^9/l$ ), připravená dvojnásobnou centrifugací bezprostředně po odběru (centrifugace minimálně 15 min při 2 000g, stažení plazmy a centrifugace 15 min při  $\geq 2 500$  g, stažení plazmy). Nesmí být použita ultracentrifugace ( $> 5 000$  g) a filtrace přes trombocytární filtry. Bezdestičková plazma (PFP) může

být použita čerstvá nebo rychle zamražená a skladovaná krátkodobě při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dlouhodobě při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  a níže. Před vyšetřením se PFP rozmrazí při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

Při diagnostice LA musí být použity minimálně 2 testy závislé na fosfolipidech s různými principy zachycujícími odlišnou část koagulační kaskády. V prvním kroku se provádí screeningové testy, v případě pozitivních výsledků alespoň jednoho ze screeningových testů se v druhém kroku provádí korekce i konfirmace.

V rámci screeningu musí být použity minimálně 2 testy s nízkou koncentrací fosfolipidů ( $\downarrow\text{PL}$ ), při vyšším počtu testů je riziko falešně pozitivních nálezů. Doporučuje se kombinace testů dRVVT a dAPTT a/nebo jiné:

- dRVVT test s jedem Russelovy zmije, který aktivuje FX v přítomnosti  $\downarrow\text{PL}$  a  $\text{Ca}^{2+}$ , je testem s vysokou specifitou, citlivý k anti $\beta$ 2-glykoproteinu 1 a vysokou korelací s trombózou. Provedení tohoto testu je nezbytné.
- dAPTT Aktivovaný parciální tromboplastinový test s  $\downarrow\text{PL}$  je testem s vysokou senzitivitou k LA.
- Silica clotting time (SCT) test s aktivátorem silica a  $\downarrow\text{PL}$  (nejsou tkáňového původu).
- dPT test s rekombinantním lidským tromboplastinem s  $\downarrow\text{PL}$  nebo komerční sety.
- Testy s využitím hadích jedů (taipan, textarin).

Korekční testy se provádí na principu těch testů, které jsou ve screeningu prodloužené ( $R > \text{cut-off}$ ) s použitím reagentů pro screening. Vyšetřuje se směs pacientovy plazmy a normální plazmy v poměru 1 : 1 bez inkubace (LA je časově nezávislý inhibitor). Provedení korekce se screeningovou a konfirmační reagentů umožní odlišení přítomnosti LA, LA + koagulopatie a koagulopatie.

Konfirmační testy se provádí na principu testů, které jsou ve screeningu prodloužené ( $R > \text{cut-off}$ ). K vyšetření se používají testy s nadbytkem fosfolipidů

( $\uparrow\text{PL}$ , neutralizační testy) nebo fosfolipidů v hexagonální fázi (test HNP). Screeningové a konfirmační reagenty by měly být od stejného výrobce a validované výrobcem pro účely použití k diagnostice LA. Používání screeningových a konfirmačních reagentů od různých výrobců a/nebo s různými aktivátory v rámci diagnostiky LA musí mít laboratoř náležitě otestováno a validováno.

Směsná normální plazma (SNP) musí být testována v každé sérii vyšetření současně se vzorky pacientů. Používá se k provedení korekčních testů a k výpočtům parametrů při vyhodnocení jednotlivých testů. SNP může být připravená laboratoří stejným způsobem jako vzorky pacientů (směs plazem LA negativních jedinců) nebo komerční validovaná výrobcem pro účely použití k diagnostice LA

Z důvodu variability reagentů a analyzátorů je pro laboratoř nezbytné nastavení horní hranice referenčních intervalů *cut-off* pro screeningové, korekční i konfirmační testy. Počet normálních vzorků pro nastavení *cut-off* musí být minimálně 40, optimálně 100–120. V případě, že výrobce reagentie udává pro daný přístroj validované *cut-off* hodnoty, je pro verifikaci doporučováno provedení vyšetření 20–60 normálních vzorků. K vyhodnocení *cut-off* se používá 99. percentil (snížení falešně pozitivních výsledků, zvýšení specifity a snížení senzitivity), příp. 97,5 percentil naměřených hodnot

Vyhodnocení testů LA zahrnuje výpočty jednotlivých parametrů z primárně naměřených koagulačních časů pacienta (tP), směsné normální plazmy (tN) v rámci screeningu (*Screen*), konfirmace (*Confirm*) a korekce (t1:1):

- pro screening výpočet Screening Ratio  $R = tP/tN$ ,  $R > \text{cut-off}$  je pozitivní;
- pro korekci výpočty Ratio  $R = t1:1/tN$ ,  $R > \text{cut-off}$  je pozitivní a Index ICA (= index cirkulujícího antikoagulans, Rösnerův index)  $\text{ICA} = [(t1:1 - tN)/tP] \times 100$ , který je vhodnějším parametrem, protože zohledňuje i tP,  $\text{ICA} > \text{cut-off}$  je pozitivní. Negativní výsledky korekce nevylučují přítomnost LA z důvodu dilučního efektu;

- pro konfirmaci výpočty Normalizované Ratio  $\text{NR} = R_{\text{Screen}}/R_{\text{Confirm}}$ ,  $\text{NR} > \text{cut-off}$  je pozitivní nebo rozdíl časů =  $t_{\text{Screen}} - t_{\text{Confirm}}$ , rozdíl časů  $> \text{cut-off} / > 8,0$  s pro HNP je pozitivní.

Kontroly kvality v rámci diagnostiky LA musí být prováděny s každou sérií vyšetření směsné normální plazmy, LA pozitivních a negativních kontrol (komerčních/připravených laboratoří).

K vyloučení jiných koagulopatií je doporučováno provedení základních koagulačních testů PT, APTT, fibrinogen, trombinový test (TT), event. test cirkulujícího antikoagulans, D-Dimery (D-Di). LA může, ale nemusí interferovat při vyšetření koagulačních faktorů. V případě snížení funkční aktivity faktorů vnitřního systému je vhodné opakovat vyšetření s APTT reagentů se sníženou citlivostí k LA a event. vyšetření faktorů v diluci nebo vyšetření faktorů s použitím chromogenních substrátů. K odlišení specifického inhibitoru od LA se využívá časová závislost inhibitoru, specifita vůči jednomu koagulačnímu faktoru a u inhibitorů faktorů vnitřní cesty toho, že není prodloužené dRVVT, které u LA prodloužené může být.

Pokud je možné vyšetření LA bez antitrombotické léčby, vždy se upřednostňuje, tj. stanovení LA by mělo být provedeno před zahájením nebo s odstupem po přerušení léčby antagonisty vitamínu K (VKA), nefrakcionovaným heparinem (UFH), terapeutickými dávkami nízkomolekulárního heparinu (LMWH) a přímými inhibitory trombinu a faktoru Xa (DOAC).

Při léčbě VKA je prodloužení testů závislých na fosfolipidech korigováno normální plazmou. Při PT-INR  $< 1,5$  se doporučuje provádět vyšetření LA v neředěné plazmě, při PT-INR = 1,5–3,0 screeningové a konfirmační testy ve směsi 1 : 1 se SNP. Negativní výsledky nevylučují přítomnost LA z důvodu dilučního efektu. Testování v neředěné plazmě může způsobit falešně pozitivní i negativní výsledky

Při léčbě UFH není doporučováno vyšetřovat LA. Pokud je vyšetřováno, tak jen při použití reagensů s heparin neutralizačními přísadami (dRVVT, HNP), ale jen v omezeném rozsahu koncentrace UFH. Interpretace výsledků musí být provedena s opatrností.

LMWH má menší vliv na testování LA, zejména v terapeutických dávkách však nelze ovlivnění vyloučit. Reagencie dRVVT s heparin neutralizačními přísadami a LMWH v profylaktických dávkách stanovení LA umožňuje.

Při léčbě DOAC, na rozdíl od VKA a deficitu faktorů, nedochází ke korekci po přidavku směsné normální plazmy. Přímé inhibitory trombinu (dabigatran a argatroban) interferují významně se všemi testy v rámci diagnostiky LA, což je riziko falešně pozitivních výsledků. Přímé inhibitory FXa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban) interferují více v dRVVT než v APTT, nelze vyloučit riziko falešně pozitivních výsledků. DOAC ovlivňují v závislosti na hladině léku zejména screeningové a korekční testy, výsledky

konfirmace (NR nebo rozdíl časů) jsou negativní, ale mohou být i falešně pozitivní. Vyšetření LA při léčbě DOAC není všeobecně doporučováno. Pokud je vyšetření LA nezbytné, musí být prováděno ve specializovaných laboratořích s dlouhodobou zkušeností s diagnostikou a interpretací výsledků LA. Předpokladem je ověření citlivosti používaných testů k DOAC a provádění vyšetření LA z odběru před podáním další dávky, tj. v době minimálního účinku léku (nutno i tak vyloučit kumulaci léku). Výjimkou může být použití DOAC-Stop tablet v laboratořích po náležitém otestování vhodnosti pro diagnostiku LA.

Vyšetření LA u pacientů s podezřením na APS nebo nevysvětlitelným prodloužením APTT při rutinním vyšetření by mělo být prováděno mimo akutní stavy, před zahájením, nebo s odstupem od přerušování antitrombotické léčby.

Interpretace výsledků testů LA v rámci diagnostiky APS musí vždy provádět zkušený pracovník v kontextu s výsledky všech laboratorních vyšetření včetně

dalších antifosfolipidových protilátek, s léčbou a klinickými projevy.

V případě positivity LA by mělo být toto vyšetření v rámci diagnostiky APS opakováno v odstupech více než 12 týdnů.

### Literatura

1. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018;16(4):809–813. doi: 10.1111/jth.13976.
2. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M: British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2012;157(1):47–58. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09037.x.
3. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the Guidelines for Lupus Anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009;7:1731–1740. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x.
4. Ledford-Kraemer M, Moore GW, et al. Laboratory testing for the lupus anticoagulant, CLSI 2014; 34 (6):116.
5. Moore GW. Recent Guidelines and Recommendation for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants. *Semin Thromb Hemost* 2014;40(02):163–171. doi: 10.1055/s-0033-1364184.

## Vývoj hemostázy od narození po stáří

Matýšková M.  
OKH FN Brno

V průběhu života dochází ke změnám ve všech systémech organismu a hemostáza není výjimkou. Vývoj systémů krevního srážení začíná brzy v embryonálním období a pokračuje po celý život. Vždy však existuje křehká rovnováha všech faktorů, jež se na hemostáze podílí, která fyziologicky brání krvácivým či trombotickým příhodám.

Hemostázu rozeznáváme fetální, neonatální, dětského věku, dospělosti a ve stáří. Ukazuje se, že v posledních týdnech gestace a v průběhu porodu dochází k dynamickým změnám ve složení krve, a tím i v koncentracích plazmatických

faktorů. Stres, který provází porod (především hormonální výkyvy) zřejmě přispívá k „vyzrávání“ hemostázy, stejně jako je v prvních hodinách po porodu hemostáza ovlivněna vyzráváním jaterního parenchymu.

Fetální a neonatální hemostáza je nevyzrálá s velmi malou rezervní kapacitou při odpovědi na patologické inzulty. V dětském věku se parametry hemostatických systémů již blíží hodnotám dospělých a zdá se, že hemostatický systém dětského věku má několik výhod oproti dospělosti, jak ukazuje například nízký výskyt trombózy, ať už z vrozených či získaných příčin.

Primární hemostáza je účinná od prvního trimestru nitroděložního života do narození. Počty krevních destiček jsou podobné jako u dospělých s úplnou expresí hlavních glykoproteinů a antigenů, což vysvětluje možnost časné trombocytopenie v případě aloimunizace. Koagulační proteiny neprocházejí placentární bariérou a začínají se syntetizovat u fetu ve stáří 10 týdnů. U zralého novorozence jsou koncentrace faktorů K-dependentní a kontaktu třetinové až poloviční oproti dospělým (bývá prodlouženým protrombinovým a parciální tromboplastinovým test). Prů-

měrné hodnoty těchto faktorů v dětství zůstávají asi o 20 % nižší, než jsou v dospělosti. Nízké hladiny K-dependenčních proteinů nelze vysvětlit nedostatkem K-vitaminu, jak ukázalo stanovení PIVKA-II antigenu, který je u fetu nepřítomen. Naproti tomu koncentrace faktorů (F) V, FVIII, von Willebrandova faktoru a FXIII se výrazně neliší od dospělých. Průměrné hodnoty fibrinogenu jsou u novorozenců srovnatelné s dospělými.

Neonatální fibrinogen je ale kvalitativně ne zcela funkční a existuje ve fetální formě přibližně do 1 roku věku. Fibrinolytická aktivita je u plodu zvýšena a kolísavá u novorozenců i přes nízké hladiny plazminogenu.

Hladiny přirozených inhibitorů (antitrombin – AT, protein C a S – PC, PS) se po narození drží asi na 1/2 hodnot dospělých, PC asi na 1/3. PS je vzhledem k velmi nízké hodnotě C4bBP při narození přítomen pouze ve volné formě. Pouze nespecifický inhibitor alfa2-makroglobulin je zvýšený. AT a PS se přiblíží koncentraci v dospělém věku kolem 6 měsíců. PC dosáhne hodnot dospělých až v pozdním dětství.

Přes veškeré odlišnosti od dospělého věku však u fyziologického novorozence a dítěte stále zůstává zachována hemostatická rovnováha.

V dospělosti vykazuje primární i sekundární hemostáza, stejně jako fibrinolýza, rozdíly mezi pohlavími. Odlišnosti se týkají především žen ve fertilním věku, protože hemostáza je ovlivněna fyziologickými změnami hormonálního stavu spojeného s menstruačním cyklem, těhotenstvím a hormonální anti-koncepcí či substituční terapií.

Se stoupajícím věkem (především nad 50 let) se signifikantně zvyšují hladiny některých faktorů, např. fibrinogenu, FVIII, FVIIa. Naproti tomu FVII, FIX, inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (PAI 1) a inhibitor zevní cesty tkáňového faktoru (TFPI) zůstávají v podstatě nezměněny, u dalších naopak dochází ke snížení (protrombin, FX, mírně i AT). Velmi významně se však zvyšují hladiny molekulární markerů aktivity koagulace i fibrinolýzy. Zatímco ve skupině zdravých osob ve věku mezi 51–69 lety je toto zvýšení cca o 25 % (D-dimery o 72 %) ve srovnání se skupinou osob mezi 18–50 lety, ve skupině zdravých stoletých osob se

jedná o zvýšení na 200–300 %, u D-dimerů dokonce více než 10x. Pro fyziologické hodnoty D-dimerů by se proto nemělo používat jedna hodnota a měl by se zohledňovat věk. Pro osoby > 50 let věku lze použít např. vzorec: horní limit normy = věk nemocného × 10 mg/l. Většina těchto změn souvisí se zvyšujícím se rizikem trombotických onemocnění se stoupajícím věkem.

## Literatura

- Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V et al. Developmental hemostasis: age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013;11:1850–1854. doi: 10.1111/jth.12372.
- Davenport, P. and Sola-Visner, M. Hemostatic challenges in neonates. *Frontiers in Pediatrics*. 2021;9:Article 627715. doi: 10.3389/fped.2021.627715.
- Favaloro EJ, Franchini M. and Lippi, G. Aging hemostasis: changes to laboratory markers of hemostasis as we age – a narrative review. *Semin Thromb Hemost* 2014. doi: 10.1055/s-0034-1384631.
- Guzzetta, NA and Miller BE. Review article. Principles of hemostasis in children: models and maturation. *Pediatric Anesthesia* 2010. doi: 10.1111/j.1460-9592.2010.03410.x.
- Mari D, Mannucci PM, Coppola R, et al. Hypercoagulability in centenarians: the paradox of successful aging. *Blood* 1995;85(11):3144–3149.

## Pacient-specifické genomické fúze BCR-ABL1 v predikci předpovědi remise bez léčby u CML

Machová Poláková K.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

V současné době je velká pozornost upřena na vysazení léčby inhibitory tyrozinových kináz (TKI) u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML), kteří jsou v odpovědi na TKI v dlouhodobých hlubokých molekulárních odpovědích (DMR). Remise bez léčby (*treatment-free remission* – TFR) byla stanovena v kontrolovaných klinických studiích. Recentně je zastavení léčby TKI již součástí doporučení Evropské Leukemické sítě (ELN) [1]. Vysazovací léčebné protokoly jsou bezpečné pro pacienty splňující definovaná kritéria při dostupnosti standardizovaného monitorování hladiny BCR-ABL1 transkriptu v mezinárodním měřítku (international scale – IS) s vyšší frekvencí vyšetřování v prvním roce po zastavení léčby. Klinické studie vysazující TKI se shodují v tom, že molekulární relapsy (ztráta velké molekulární odpovědi MMR odpovídající hladině 0,1 % BCR-ABL1 v IS) se nejčastěji objevují v průběhu prvních 6 měsíců od vysazení léčby.

Bylo zjištěno, že BCR-ABL1 pozitivní leukemické kmenové buňky mohou díky senescenci a mikroprostředí kostní dřeně přetrvávat u některých pacientů, u nichž není detekována měřitelná reziduální nemoc (MRN) na úrovni transkriptu BCR-ABL1 [2]. Detekce a kvantifikace BCR-ABL1 na úrovni DNA může indikovat přetrvání leukemických buněk, přestože exprese BCR-ABL1 není detekována. Nedávné práce ukazují, že detekce MRN na úrovni DNA může odhalit CML buňky z řad kmenových či lymfoidních buněk [3].

Mezinárodní studie European Treatment and Outcome Study for CML 2018 (EUTOS 2018) měla za cíl zavést u pacientů s CML kvantifikaci pacient-specifických genomických fúzí BCR-ABL1

a zjistit klinickou relevanci monitorování MRN na úrovni DNA. Pro charakterizaci pacient-specifických fúzí BCR-ABL1 na úrovni DNA (gBCR-ABL1) byl zaveden postup využívající technologii sekvenování nové generace (NGS), která využívá set 4 608 prób, které pokrývají geny *BCR* a *ABL1* tak, aby byla vysoká pravděpodobnost detekovat většinu gBCR-ABL1 fúzí. Následně bylo nutné zavést metody pro kvantifikaci gBCR-ABL1 fúzí za použití kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a kapkovou digitální PCR (ddPCR). Pro srovnání kvantifikace BCR-ABL1 na úrovni DNA a transkriptu (mRNA) bylo nutné vyjít ze stejného množství buněk pro izolaci obou nukleových kyselin, aby byla zajištěna shodná citlivost měření, která byla ještě stanovena kontrolními geny; *ALB* (gen kódující albumin) pro DNA měření a *GUSB* ( $\beta$ -glukuronidáza) pro mRNA měření. Podmínky a kritéria pro qPCR analýzy a pravidla pro hodnocení MRN byly převzaty dle standardizované metody pro kvantifikaci pacient-specifických přestaveb Ig/TCR mezinárodním konsorciem EURO-MRD [4].

Práce EUTOS 2018 [5] ukázala, že hladiny gBCR-ABL1 korelují s hladinami mRNA u vzorků s expresí  $\geq 0,01$  % BCR-ABL1RelDg (BCR-ABL1RelDg = hladiny BCR-ABL1 vztažené k hladině v době diagnózy, která byla určena jako 100 %), což je v souladu se zjištěním autorů Paganiet al. [3]. Rovněž nebyl prokázán rozdíl v individuální dynamice hladiny DNA a mRNA BCR-ABL1 v průběhu prvního poklesu BCR-ABL1 po zahájení léčby TKI s využitím modelů bi-exponenciálních smíšených efektů [6]. Odlišnosti mezi detekcí BCR-ABL1 na úrovni DNA a mRNA byly zjištěny pod hladinou 0,01 % BCR-

-ABL1RelDg. DNA analýzy BCR-ABL1 detekovaly reziduální CML buňky častěji v porovnání s mRNA analýzami u signifikantního počtu vzorků u pacientů v průběhu jejich sledování. S použitou metodikou byla zjištěna shodná technická citlivost DNA a mRNA analýz, proto lze vyšší „citlivost“ DNA analýz přisuzovat biologickému pozadí. Konkrétně zajímavou skupinu tvoří pacienti, kteří v průběhu dlouhodobých DMR mají MRN detekovatelnou na úrovni DNA, ale na úrovni transkriptu se jeví jako negativní. Toto zjištění by mohlo být zajímavé v kontextu odhadu pravděpodobnosti TFR. V kohortě 42 pacientů, u kterých byla léčba TKI vysazena (klinická studie EURO-SKI; [7]) či přerušována ob měsíc (INTreg), byla sledována MRN v průběhu trvání DMR před zastavením/přerušením léčby na úrovni DNA a mRNA s využitím ddPCR. DNA a mRNA status v průběhu trvání DMR byl hodnocen pomocí deterministického modelu a umožnil stratifikaci typu semafor, který signifikantně předpovídá přežití bez molekulární relapsy (*molecular relapse-free survival* – MRFS) po zastavení/přerušení podávání TKI. Zelená skupina (DNA negativní/RNA negativní DMR před zastavením léčby) má nejvyšší pravděpodobnost MRFS po zastavení/přerušení léčby, žlutá (DNA pozitivní/RNA negativní) má střední pravděpodobnost a červená (DNA pozitivní/mRNA pozitivní) má nízkou pravděpodobnost MRFS.

Žlutá skupina (DNA pozitivní/mRNA negativní) je zajímavá z biologického hlediska, jelikož zde vyvstává otázka, jaký typ buněk, které neexprimují *BCR-ABL1*, je detekován na úrovni DNA v periferní krvi u pacientů v DMR. Paganiet al. [3] u pacientů v TFR zjistili, že DNA



pozitivní buňky, které byly mRNA negativní, patří do lymfoidní skupiny buněk. Přítomnost těchto buněk a jejich dopad na TFR je nutné dále studovat.

Na základě ELN doporučení 2020 lze vysadit léčbu TKI již v běžné lékařské praxi, ale pouze u pacientů s transkripty nesoucími přestavbu major (e13a2 nebo e14a2) [1]. Navazující práce (Žižková et al., abstrakt č. 144) analogicky jako v případě pacientů s přestavbami major při porovnání hladin mRNA a DNA BCR-ABL1 ukazuje, že u pacientů s raritními přestavbami (e19a2; e13a3, e1a2, e6a2) se jeví zastavení TKI léčby jako bezpečné zejména s použitím BCR-ABL1 analýzy na úrovni DNA s použitím ddPCR.

Kolaborativní práce EUTOS 2018 ukázala, že stanovení MRN na základě gBCR-ABL1 analýz nepřináší novou informaci v porovnání s mRNA analýzou v průběhu iničiálního poklesu BCR-ABL1 od zahá-

jení léčby TKI [5]. Avšak v průběhu dlouhodobé DMR analýzy založené na DNA precizují MRN monitorování s přínosem především v predikci TFR. Bude zapotřebí dalších prací, které pomohou validovat navrhovaný stratifikační model, což je plánováno v české akademické klinické studii HALF (multicentrická akademická studie fáze II vysazující inhibitory tyrozinkináz po dvoustupňové redukci dávky u pacientů s CML; ClinicalTrials.gov NCT04147533; viz. Žáčková et al., abstrakt č. 49), která zařazuje i pacienty s raritními přestavbami.

### Literatura

1. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020;34:966–984.
2. Ross DM, Pagani IS, Shanmuganathan N, et al. Long-term treatment-free remission of chronic myeloid leukemia with falling levels

of residual leukemic cells. *Leukemia*. 2018;32:2572–2579.

3. Pagani IS, Dang P, Saunders VA, et al. Lineage of measurable residual disease in patients with chronic myeloid leukemia in treatment-free remission. *Leukemia*. 2020;34:1052–1061.
4. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21:604–611.
5. Machova Polakova K, Zizkova H, Zuna J, et al. Analysis of chronic myeloid leukaemia during deep molecular response by genomic PCR: a traffic light stratification model with impact on treatment-free remission. *Leukemia*. 2020;34(8):2113–2124.
6. Glauche I, Kuhn M, Baldow C, et al. Quantitative prediction of long-term molecular response in TKI-treated CML – lessons from an imatinib versus dasatinib comparison. *Sci Rep*. 2018;8:12330.
7. Saussele S, Richter J, Guilhot J, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a pre-specified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:747–757.

## „CML-like“ leukémie

Zuna J.

CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

Jednou z primárních genetických aberrací, nacházenou u různých typů hematologických malignit a charakteristikou zejména pro chronickou myeloidní leukémii (CML), je fúzní gen *BCR-ABL1*, jehož chromozomálním podkladem je translokace t(9;22)(q34;q11). Fúzní gen se nachází na derivovaném chromozomu 22 označovaném jako Philadelphia (Ph) chromozom. Kromě CML se vyskytuje i u lymfomů a u leukémií akutních, především u akutní lymfoblastické leukémie (ALL). Jeho zastoupení mezi ostatními ALL narůstá s věkem – u dětí tvoří *BCR-ABL1*-pozitivní leukémie asi 3 % všech ALL, u starších dospělých je to pak až přes 30 %.

ALL s fúzním genem *BCR-ABL1* patří jak u dětí, tak u dospělých k podtypům

s nejhorší prognózou. Ta se v posledních letech sice významně zlepšila díky zavedení cílené terapie pomocí specifických tyrosin-kinázových inhibitorů (TKI), stále je však horší než u většiny ostatních podskupin ALL.

Prognostický význam minimální reziduální nemoci (MRN) u pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL je méně jednoznačný než u jiných podtypů – a to zvláště v éře TKI.

Naše původní práce z roku 2009 [1] porovnávala hladiny MRN naměřené standardní metodikou používanou u dětských ALL, tedy pomocí kvantifikace klonálně-specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR), a metodikou kvantifikace fúzního transkriptu *BCR-ABL1*. Na rozdíl

od jiných fúzních genů (*ETV6-RUNX1* či různé fúze genu *KMT2A*) byla korelace mezi hladinami naměřenými kvantifikací transkriptu *BCR-ABL1* a přestavb Ig-TCR nečekaně nízká, a to především kvůli vzorkům *BCR-ABL1*-pozitivním/Ig-TCR-negativním. Podobné výsledky později přinesla i naše společná studie v rámci mezinárodního léčebného protokolu pro Ph-pozitivní dětské ALL, EsPhALL [2]. Protože však při tomto typu srovnání porovnáujeme kvantifikaci MRN založenou na DNA (Ig-TCR) a na RNA či cDNA (*BCR-ABL1* transkript), mohou být výsledky ovlivněné mírou exprese leukemických buněk, a to například i v závislosti na probíhající terapii.

Proto jsme v laboratořích CLIP postupně pro *BCR-ABL1*-pozitivní leu-

kémie zavedli metody charakterizace zlomů mezi geny *BCR* a *ABL1* na DNA úrovni (zpravidla v intronových oblastech, které mají celkový rozsah přes 200 kb). Genomické zlomy pak používáme jako pacient-specifické cíle pro sledování MRN, tedy kvantifikaci *BCR-ABL1*-pozitivních buněk na DNA úrovni.

Tím se srovnání hladin *BCR-ABL1* a Ig-TCR stává přímočařejším a není nijak ovlivněno mírou RNA exprese či probíhající terapií.

Výsledky takového srovnání u téměř 50 pacientů s dětskou *BCR-ABL1*-pozitivní ALL jsme publikovali v roce 2017 [3]. Potvrdili jsme špatnou korelaci mezi oběma metodami, i zde způsobenou vzorky pozitivními na *BCR-ABL1*, ale negativními na Ig-TCR úrovni. Navíc jsme ukázali, že se tyto nekorelující vzorky nenacházejí u všech pacientů – zatímco u většiny (70–80 %) korelují hladiny v průběhu celého sledování velmi dobře, asi u čtvrtiny pacientů vi-

díme obvykle dobrou léčebnou odpověď podle monitorování Ig-TCR, hladiny *BCR-ABL1* však zůstávají po delší dobu významně vyšší. U těchto pacientů jsme pomocí sortování buněčných subpopulací a jejich analýzy prokázali, že zatímco Ig-TCR přestavby jsou – podle očekávání – přítomné skutečně pouze v dominantním, lymfoidním leukemickém klonu, fúzi *BCR-ABL1* nacházíme již při diagnóze onemocnění i v asi 20 % B-buněk mimo leukemický klon, v T-buňkách a také v buňkách myeloidních. Pro biologickou podobnost s CML (v lymfoidním blastickém zvratu) jsme tyto leukémie pojmenovali „*CML-like* leukémie“.

Nyní pokračujeme ve studiu těchto leukémií, z klinického pohledu se snažíme upřesnit prognostický význam MRN sledované různými metodami a optimální terapii těchto leukémií. Z pohledu biologického se pak zabýváme mechanismem a strukturou genomic-

kých zlomů, otázkami klonální architektury jednotlivých podtypů *BCR-ABL1*-pozitivních leukémií a celkově rozdílů mezi „typickou ALL“, „*CML-like*“ leukémií a „typickou CML“.

## Literatura

1. Zaliouva M, Fronkova E, Krejčíková K, et al. Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring. *Leukemia*. 2009;23(5):944–951.
2. Cazzaniga G, De Lorenzo P, Alten J, et al. Predictive value of minimal residual disease in Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib in the European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, based on immunoglobulin/T-cell receptor and BCR/ABL1 methodologies. *Haematologica*. 2018;103(1):107–115.
3. Hovorkova L, Zaliouva M, Venn NC, et al. Monitoring of childhood ALL using *BCR-ABL1* genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology. *Blood*. 2017;129(20):2771–2781.

## Interferony v léčbě Ph-negativních myeloproliferací

Schwarz J.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Cytoreduktivní terapie interferonem-alfa (IFN) je nedílnou součástí doporučení pro léčbu Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií (MPN). Hlavním cílem této léčby je snížit počty krevních elementů především za účelem prevence trombotických (případně i krvácivých) komplikací, které jsou celoživotní hrozbou pro pacienty s MPN, především (ale nejen) těch s mutací *JAK2*. Ukázalo se, že kontrola parametrů červené řady i počtu trombocytů je důležitá z hlediska prevence trombóz, především venózních, ale i arteriálních a mikrocirkulačních [1,2].

IFN je užíván v léčbě 1. linie u mladších pacientů s esenciální trombocytémií

(ET) a s proliferativními stádii primární myelofibrózy (PMF), alternativou v léčbě je zde anagrelid. Nejuniverzálnější indikací pro IFN je podle všech současných doporučení pro mladší nemocné polycythaemia vera (PV) [3]. IFN je užíván běžně (není-li kontraindikace) u osob do 65 let (v doporučeních CEMPO [4] jej lze užít i u fit pacientů do 70 let) v 1. linii léčby. IFN lze použít i pro léčbu 2. linie u (obvykle starších) pacientů s MPN, u kterých v primární léčbě selhala hydroxyurea. Navíc je léčba IFN jedinou možností cytoredukce u těhotných a kojících.

IFN se užívá pro léčbu různých typů MPN od poloviny 80. let [5,6]. V té době se podávala (podle vzoru chemoterapie

jiných malignit) tzv. indukční léčba poměrně vysokými dávkami IFN, teprve pak se pro udržovací léčbu dávky snižovaly. Tato léčba (původně i.m. aplikace) byla zatížena vysokou měrou nežádoucích účinků (horeček, flu-like sy., cytopenií, autoimunitních stavů – nejčastěji thyreoidity, nežádoucích účinků v GIT, poruch nálady a depresí, neurotoxicity), s nimiž souvisela také intolerance ze strany nemocných. Teprve postupem času se dávky v úvodu léčby snižovaly, podávaly se s.c., a nežádoucích účinků tak ubývalo. R.T. Silver v New Yorku [7] zavedl léčbu tzv. nízkými dávkami standardního rekombinantního IFN. Podle něj se léčba zahajovala dávkami 3 MIU

3× týdně. Toto schéma přineslo další pokrok pro toleranci ze strany pacientů. Nicméně vlastní zkušenosti ukazují, že léčbu je vhodné zahajovat ještě nižšími jednotlivými dávkami IFN, cca 1–1,5 MIU denně. Další pokrok v užití IFN znamenalo zavedení depotních, pegylovaných IFN. I u nich bylo důležité začínat léčbu co nejnižší dávkou (cca 45–90 µg 1× týdně) – jistě menší než v klinických studiích. Technologicky nejvyspělejším IFN je monopegylovaný IFN  $\alpha$ -2b, ropeginterferon, který má jen 1 izoformu (tj. je „nejčistší“ na elektroforéze) díky inovativní pegylační technologii přes molekulu prolinu. Právě díky tomu je možné jej podávat v co nejdelších intervalech (zpočátku 1× za 2 týdny cca 50–100 µg, v udržovací léčbě potom vytitrovanou dávkou až 1× měsíčně) při relativně nečetných nežádoucích účincích a vysoké tolerabilitě pacientů.

Studie s pegylovanými IFN ukázaly relativně dobrou toleranci a účinnost nejen z hlediska hematologické odpovědi na léčbu (kontroly všech řad v krevním obraze), ale i významné snížení nálože mutované alely *JAK2*; někteří pacienti dosáhli vymizení detekovatelné mutace *JAK2*, tzn. molekulární remise [8]. Randomizovaná studie PROUD-PV a PV-CONTINUATION srovnala účinnost ropeg-IFN a hydroxyurey a ukázala lepší efekt ropeg-IFN na docílení jak hematologické, tak i molekulární remise, ačkoli v prvních 18 měsících sledování tomu bylo naopak [9]. Jinými cytoreduktivy než IFN se molekulární remise dlouhodobě nedosáhne. Výhody IFN totiž převládají až při dlouhodobé terapii. Ukazuje se, že IFN může ovlivnit biologický průběh onemocnění, a např. u PV se již prokázalo, že IFN snižuje riziko přechodu do post-PV myelofibrózy a zlepšuje i celkové přežití pacientů [10].

V ÚHKT jsme nedávno retrospektivně analyzovali 82 MPN pacientů (42 s PV, 27 s PMF, 12 s ET a 1 pacient měl neurčenou MPN s trombocytémií), léčených IFN (54 z nich standardním, 26 pegylovaným a 2 ropeg-IFN), u kterých byla zahájena léčba v posledních 15 letech. Me-

dián doby na léčbě byl u nich delší než 4 roky. Studie ukázala výbornou účinnost IFN i jeho toleranci pacienty. Kompletní remisi docílilo 69 z nich, 2 remisi parciální, pouze 1 pacientka s PV na léčbu neodpověděla (i v kombinaci s dvěma dalšími cytoreduktivy i JAK-inhibitorem, pravděpodobně se mohlo jednat o problém s compliance k léčbě). U 20 pacientů s mutací *CALR* i u 3 nemocných „triple-negativních,“ tj. bez mutací *JAK2*, *CALR* a *MPL*, nebyla odpověď horší než u pacientů s mutací *JAK2*. Ukončení léčby bylo potřebné u 17/82 (20,7 %) pacientů, tzn. 79,3 % je stále na léčbě. Desetiletý výhled podílu nemocných na léčbě byl 69 % pro standardní IFN a 100 % v 28členné skupině léčené pegylovaným IFN nebo ropeg-IFN. Tyto velmi dobré výsledky jsou patrně dány vhodným výběrem pacientů, včasným nasazením léčby (IFN se nehodí k léčbě pokročilejších stádií MPN, např. těch s výraznou hepatosplenomegalií), nízkými dávkami IFN při zahajování léčby a relativně častými kombinacemi při zahájení (celkem 30; u 19 byl zároveň podáván také anagrelid, u 8 hydroxyurea). Kombinace jsou velmi vhodné v začátcích léčby a je potřeba jmenované látky vysazovat pomalu, a přitom jen pozvolna navyšovat, resp. titrovat dávkou IFN. U některých pacientů s PV lze užít občasnou venepunkci k dosažení cílových hodnot hematokritu pod 45. Je třeba si uvědomit, že optimum účinku IFN z hlediska parametrů červené řady nastává za cca 6–12 měsíců od zahájení léčby. Snížení počtu leukocytů i trombocytů lze naopak dosáhnout poměrně rychle, v řádu týdnů. Nicméně případy MPN s extrémními hodnotami hematokritu či počtu trombocytů je šikovnější řešit aferézami a hydroxyureou, a teprve potom pacienty převádět na IFN a/nebo anagrelid. Hydroxyureu lze podávat bez rizika leukemogenity několik let (ale ne zbytečně dlouho).

Z nežádoucích účinků při šetrném dávkování vidáme zpočátku léčby flu-like sy., který jen vzácně vede k intoleranci přípravku, subfebrilie (ale vyšší

febrilie vzácně), hepatopatii, vzácně poruchy nálady (nelze je však nikdy podceňovat), neuropatii. Pruritus může být projevem aktivace buněčného cyklu (a tomu odpovídajícím změnám v tvorbě cytokinů) vlivem IFN v prvních měsících léčby, může být i úporný. Častá je i indukce tvorby anti-thyroidálních i anti-thyreoglobulinových protilátek, které však málokdy vedou k poruše tvorby hormonu, takže není nutné IFN vysazovat nebo snižovat jeho dávku, je však nutno pečlivě monitorovat.

V České republice je možnost preskripce IFN hematologem. Dostupnost standardních IFN se však nepředpokládá již od konce r. 2021, u Pegasysu (pegylovaného IFN) od jara 2022. Všechny standardní i pegylované formy jsou u MPN off-label indikací (on-label z hematologických indikací jsou pouze chronická myeloidní leukémie, vlasatobuněčná leukémie a kožní T-lymfom). Nyní však mají povolenou úhradu pro MPN ze strany VZP. Ropog-IFN (Besremi) má evropskou registraci EMA v indikaci PV, ale ne jiných MPN či jiných onemocnění. Nemá však v ČR úhradu, tudíž musí být žádán na § 16. Besremi bude patrně jediným dostupným IFN na trhu od roku 2022.

Závěrem: Léčba MPN interferonem je léčbou přítomnosti i budoucnosti, obavy z jeho podávání (v šetrných dávkách) nejsou na místě. Není leukemogenní (na rozdíl od cytostatik), a jde o preferovanou léčbu 1. linie neseniorních pacientů s PV. U pacientů s PV snižuje riziko přechodu do post-PV myelofibrózy a zlepšuje i celkové přežití pacientů. Lze anticipovat, že podobný efekt uvidíme i u pacientů s pre-PMF, ale to ještě prokázáno nebylo. IFN lze použít i u ET jako alternativu anagrelidu, avšak z ekonomického i biologického hlediska pro něj autor zatím vidí indikaci jen u pacientů s kontraindikacemi anagrelidu nebo s problémy při jeho užití. Kombinace IFN s dalšími cytoreduktivy (anagrelidem, nebo krátkodobě hydroxyureou) jsou u některých pacientů velmi přínosné, dovolují užít nižší, tolerovatelné dávky léčiv. Kombinace s dalšími látkami

ovlivňujícími JAK-STAT signalizaci, např. JAK-inhibitory nebo statiny, jsou předmětem studií a jsou do budoucnosti příslibem.

## Literatura

1. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2013;368:22–33. doi: 10.1056/NEJMoa1208500.
2. Schwarz J, Ovesná P, Černá O, et al. Thrombosis in thrombocytemic Ph- myeloproliferations is associated with higher platelet count prior to the event: results of analyses of prothrombotic risk factors from a registry of patients treated with anagrelide. *Eur J Haematol*. 2016;96:98–106. doi: 10.1111/ejh.12554.
3. Schwarz J, Penka M, Campr V, et al. Diagnostika a léčba BCR/ABL-negativních myeloproliferativních onemocnění – principy a východiska doporučení CZEMP. *Vnitř lék*. 2011;57:189–213.
4. Hatalova A, Schwarz J, Gotic M, et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of patients with polycythaemia vera. *Eur J Haematol*. 2018;101:654–664. doi: 10.1111/ejh.13156.
5. Velu T, Delwiche F, Gangji D, et al. Therapeutic effect of human recombinant interferon-alpha-2C in essential thrombocythaemia. *Oncology* 1985;42(Suppl 1):10–14.
6. Linkesch W, Gisslinger H, Ludwig H, Flener R, Sinzinger H. Therapy with interferon (recombinant IFN- $\alpha$ -2C) in myeloproliferative diseases with severe thrombocytoses. [V němčině]. *Acta Med Austriaca*. 1985;12:123–127.
7. Silver RT. Long-term effects of the treatment of polycythemia vera with recombinant interferon- $\alpha$ . *Cancer*. 2006;107:451–458. doi: 10.1002/cncr.22026.
8. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, et al. Pegylated interferon- $\alpha$ -2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008;112:3065–3072.
9. Gisslinger H, Klade C, Georgiev P, et al. Ropoginterferon alfa-2b versus standard therapy for polycythaemia vera (PROUD-PV and CONTINUATION-PV): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial and its extension study. *Lancet Haematol*. 2020;7:e196–e208, doi: 10.1016/S2352-3026(19)30236-4.
10. Abu-Zeinah G, Krichevsky S, Cruz T, et al. Interferon-alpha for treating polycythemia vera yields improved myelofibrosis-free and overall survival. *Leukemia* 2021. doi: 10.1038/s41375-021-01183-8.

# Akutní lymfoblastická leukémie dospělých. Protokoly a studie v ČR

Šálek C.<sup>1</sup>, Doubek M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

<sup>2</sup> Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

Standardní léčba nově diagnostikované akutní lymfoblastické leukémie (ALL) mladších dospělých je v současnosti formována principy blokové léčby pediatrických pacientů. Je založena na kortikoidní přefázi, útočné indukční léčbě kombinující až osm chemoterapeutik v časově i dávkově intenzivním režimu, konsolidační léčbě, jejíž intenzita je určována mírou individuální léčebné odpovědi na předchozí fázi, a léčbě udržovací. Integrovaní součástí těchto protokolů je zařazení asparaginázy a v případě ALL z prekursorů B-buněk také rituximabu. Mírou individuální léčebné odpovědi je nálož minimální reziduální nemoci (MRN) měřené standardizovanou PCR metodikou pomocí primerů detekujících specifickou přestavbu v genech pro imunoglobulinové řetězce konkrétního leukemického klonu. Takto hodnocená MRN je svrchovaným prognostickým faktorem pro přežití, a proto je její hodnota měřená v konkrétních fázích léčby používána jako faktor určující intenzitu konsolidační léčby, zejména indikaci alogenní transplantace kmenových buněk krvetvorby (aloHSCT).

Prvním protokolem postaveným na uvedených zásadách, jenž byl používán v České republice, bylo studijní schéma německé skupiny GMALL 07/2003. Tuto léčbu propaguje od roku 2007 Česká leukemická skupina – pro život (CELL), která na základě prvotních zkušeností léčebné schéma mírně modifikovala jako protokol ALL CELL Junior 2012.

V případě Ph+ ALL týž protokol začlenil prvogenerační inhibitor tyrozinové kinázy (TKI) imatinib podávaný kontinuálně již od zahájení indukční fáze léčby. Současně bylo možné vynechat

z časných fází terapie značně myelotoxické antracykliny, což se odrazilo ve snížení incidence infekčních komplikací, vyšší počtu dosažených remisí a vysokému procentu provedených aloHSCT, která byla donedávna považována za jediný kurativní přístup Ph+ ALL.

Prognóza relabované ALL léčené standardní chemoterapií je kritická. Zvrat u B-ALL přinesla nová cílená léčiva, zejména blinatumomab, bispecifická monoklonální protilátka anti-CD19/anti-CD3, inotuzumab ozogamicin, imunokonjugát protilátky anti-CD19 s cytotoxickým jadem calicheamicinem. Obě léčiva v monoterapii prokázala bezprecedentní účinnost u relapsů ALL, vč. časných a potransplantačních relapsů. Obě látky jsou nyní považovány za standard léčby relabované B-ALL, ačkoliv délka trvání remisí je bez další léčby neuspokojivě krátká. Výchoziskem z této situace se zdá být časné zahájení léčby již ve fázi molekulárního relapsu (v případě blinatumomabu) nebo využití těchto preparátů k dosažení remise a následné intenzifikaci terapie pomocí aloHSCT. U mladých dospělých do 25 let věku s refrakterní B-ALL nebo relapsem po transplantaci či v 2. a pozdějším relapsu představuje naději terapie autologními T-lymfocyty s chimerickým antigenním receptorem (CAR-T), která je od září 2019 dostupná i v ČR.

Zkušenosti s moderní cílenou terapií v relapsu ALL vedly k experimentálnímu začlenění těchto preparátů do léčby první linie. První studie proběhly u pacientů vyššího věku a kombinovaly inotuzumab ozogamicin s výrazně redukcovanou chemoterapií u Ph- ALL nebo blinatumomab s TKI III. generace ponatibem u Ph+ ALL.

Prvotní sdělení zatím jen s krátkou dobou sledování ukazují počty remisí a přežití srovnatelné či lepší než u intenzivně léčených mladších nemocných.

Uvedená data se stala inspirací pro akademické klinické projekty, které přinášejí možnost léčby jmenovanými cílenými preparáty již v první linii i pro české pacienty. Prvním z nich je studie Evropské pracovní skupiny pro ALL dospělých (EWALL) kombinující inotuzumab ozogamicin s nízkými dávkami chemoterapie v indukční léčbě starších pacientů s Ph-negativní BCP-ALL ALL. Další dvě studie jsou ryze české a autorsky vznikly na půdě CELL. Jedná se o studii Blina-CELL, v níž blinatumomab nahrazuje první indukční cyklus léčby Ph- ALL, a Pona-CELL kombinující ponatinib s redukcovanou chemoterapií v první linii léčby Ph+ ALL. Cílem obou studií je dosažení časné negativy MRN, a tím pozitivní ovlivnění prognózy nemocných. V případě ponatinibu u Ph+ ALL se předpokládá, že té části pacientů, kteří dosáhnou kompletní molekulární odpovědi, studie otevře cestu k netransplantační léčbě Ph+ ALL.

Průběžné výsledky studie Blina-CELL po 16 zařazených pacientech ukazují na vysoké procento kompletních remisí po indukční léčbě blinatumomabem (15/16, 94 %). V týdnu 18 mělo 12 z 13 hodnotitelných pacientů (92 %) dokumentovanou kompletní molekulární odpověď. Žádný pacient nebyl z důvodu nedostatečné molekulární odpovědi indikován k aloHSCT.

V přednášce budou poprvé prezentovány průběžné výsledky studie Blina-CELL i ostatních výše zmíněných akademických studií.

# Akutní myeloidní leukémie u dětí a dospívajících

Starý J., Kubričanová Žaliová M.

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

Akutní myeloidní leukémie (AML) tvoří u dětí 15 % leukémií, a je tak vzácným onemocněním, postihujícím ročně v České republice 12–15 dětí a dospívajících ve věku do 18 let. Jedná se o heterogenní skupinu nemocí, jež byly v minulosti děleny dle morfologické FAB klasifikace. Souvislost mezi cytogenetickými změnami v nádorových buňkách a prognózou pacientů a zavedení molekulárních genetických metod do rutinní diagnostiky vedly k změně klasifikace AML dle genetických změn.

Ve srovnání s dospělými mají děti s AML lepší výsledky léčby z důvodu nižšího výskytu nepříznivých genetických mutací a schopnosti lépe tolerovat intenzivní chemoterapii a transplantaci krvetvorných buněk (HSCT). Akutní promyelocytární leukémie (APL) a myeloidní leukémie dětí s Downovým syndromem (ML-DS) jsou vyřazeny z léčebných AML studií z důvodu odlišné léčby a lepší prognózy.

## BIOLOGIE AML U DĚTÍ

Cytogenetické vyšetření, vyšetření exomu, genomu a transkriptomu nádorových buněk, vč. morfologie blastů a klinických projevů nemoci nachází podstatné rozdíly mezi dětmi mladšími 3 let, věkovou kategorií 3–14 let a AML dospívajících starších 15 let, která je biologii totožná s onemocněním mladých dospělých do věku 39 let [1]. Ve srovnání s dospělými mají děti s AML daleko více genových fúzí a významné rozdíly v nejčastěji mutovaných genech. U dětí mladších 3 let dominuje monocytární leukémie M5 dle FAB s přestavbou genu *KMT2A* (dříve *MLL*), charakterizovaná vysokým výskytem extramedulární leukémie (infiltrace CNS, leukemická kůže, myelosarkom orbity). Přesto mají malé děti s *KMT2A* genovými fúzemi lepší pro-

gnózu než děti starší s tímto genotypem. Dvě třetiny dětí s neonatální leukémií mají akutní monocytární leukémii s přestavbou *KMT2A*. Druhým nejčastějším typem leukémie je ve věkové kategorii do tří let megakaryocytární leukémie M7 dle FAB (AMKL) spojovaná s Downovým syndromem (DS) nebo řadou rekurujících strukturálních chromozomálních aberací a komplexním karyotypem (~ 50 %) u dětí bez DS (non-DS AMKL). Naopak se v této věkové kategorii prakticky nevyskytují mutace genu *FLT3*, *APL* a *t(8;21)/RUNX1-RUNXT1* [2]. Děti mezi 3–15 lety mají vyšší zastoupení prognosticky příznivé Core binding factor (CBF+) pozitivní AML s genovými fúzemi *RUNX1/RUNXT1* a *CBFB-MYH11*, *APL* (12 %), *NPM1+* (20 %) a *CEBPA+* (10 %) AML než děti mladší. S věkem stoupá výskyt mutací *FLT3* (15–20 %) a normálního karyotypu (~ 25 %) [3]. Přehled výskytu nejčastějších fúzních genů a molekulárních lézí je uveden v tab. 1.

Charakteristika vybraných genetických podtypů AML

## AML S PŘESTAVBOU GENU *KMT2A*

Monocytární leukémie s přestavbou genu *KMT2A* tvoří 20–25 % AML dětského věku s více než 100 různými fúzemi, z nichž 9 pokrývá 90 % všech nacházených přestaveb *KMT2A*. Nejčastější fúzní partner (40 %) je *AF9*, následuje *AF10* (20 %). Prognóza onemocnění závisí na fúzním partnerovi. Pacienti s *t(6;11)/KMT2A-AF6* a *t(10;11)/KMT2A-AF10* a *KMT2A-ABI1* mají velmi špatnou prognózu a jsou indikováni k HSCT v první remisi (CR1), pacienti s *t(1;11)/KMT2A-AF1Q* mají prognózu excelentní, zatímco nejčastější translokace *t(9;11)/KMT2A-AF9* má intermediární prognózu a většina pacientů je vyléčitelná chemoterapií [4].

## CBF + AML

Oba zástupci *t(8;21)/RUNX1-RUNXT1* a *inv(16)/CBFβ-MYH11* této u dětí relativně časté leukémie (~ 20 %) mají velmi dobrou prognózu (přežití > 80 %) při použití současných léčebných protokolů, a i když rychlost poklesu a vymizení minimální reziduální nemoci (MRN) mohou být pomalé, není to indikací k HSCT v CR1. Děti s *inv(16)* mají častěji vyšší leukocytózu a extramedulární projevy leukémie než je tomu u *t(8;21)*, jejich odpověď na léčbu je ale excelentní a je u nich možné se obejít bez indukce s vysokodávkovaným cytosin arabinosidem (HD-AraC).

## AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE

APL s *t(15;17)/PML-RARA* tvoří 5–15% AML u dětí a biologii se neliší od stejného onemocnění dospělých s výskytem koagulopatie, rizikem časně smrti a excelentní léčebnou odpovědí na léčbu retinoidy a arsenikem s vyšším rizikem vzniku diferenciacního syndromu, než je tomu u dospělých.

## MYELOIDNÍ LEUKÉMIE DĚTÍ S DOWNOVÝM SYNDROMEM

Děti s Downovým syndromem mají 50násobně vyšší výskyt AML než děti zdravé a sníženou toleranci intenzivní chemoterapie. Přibližně 10 % novorozenců s DS vyvine transientní abnormální myelopoezu (TAM), charakterizovanou zvýšeným procentem megakaryocytárních blastů v kostní dřeni a periferní krvi, leukocytózou, trombocytopenií a fibrózou jater s rizikem smrti na komplikace. Molekulárním vyšetřením je nacházena u všech dětí mutace transkripčního hematopoetického faktoru *GATA1* ve spojení s trizomií chromozomu 21. TAM u většiny dětí spontánně

**Tab. 1. Vybrané rekurující chromozomální aberace a molekulární léze u AML v dětském věku.**

Genetická změna	Incidence	Prognóza	Poznámka
<i>PML-RARA</i>	5–10 %	příznivá	cílená léčba ATRA + ATO
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	10–15 %	příznivá	–
<i>CBFB-MYH11</i>	10–15 %	příznivá	–
<i>KMT2A</i> přestavba	20–25 %	intermediální	prognóza závisí na partnerském genu
<i>NUP98</i> fúze	4–5 %	nepříznivá	kombinují se často s <i>FLT3-ITD</i> a <i>WT1</i> mutacemi
<i>DEK-NUP214</i>	1–2 %	nepříznivá	<i>FLT3</i> mutace u 70 %
<i>KAT6</i> fúze	< 1 %	nepříznivá	–
Monozomie 7	1–3 %	nepříznivá	relativně častá u CBF + AML bez prognostického významu
<i>ETV6-MNX1</i>	1 %	nepříznivá	30 % AML u kojenců
<i>CBFA2T3-GLIS2</i>	3 %	nepříznivá	malé děti, 20 % AMKL
<i>RBM15-MKL1</i>	~10 % AMKL	intermediální	–
<i>HOX</i> fúze	~15 % AMKL	intermediální	–
<i>FLT3-ITD</i> mutace	15–20 %	nepříznivá při vysokém alelickém poměru, v kombinaci s <i>WT1</i> mutací nebo <i>NUP98</i> fúzemi, příznivá v kombinaci s <i>NPM1</i>	–
<i>NPM1</i> mutace	~10 %	příznivá	často se spojují s <i>FLT3-ITD</i>
<i>CEBPA</i> bialelická mutace	5–10 %	příznivá	–
<i>WT1</i> mutace	15 %	neutrální, nepříznivá při kombinaci s <i>FLT3-ITD</i>	–

vymizí, ale u 20–30 % z nich se s odstupem měsíců vyvine AMKL, která může vzniknout i bez předchozí TAM. Postihne typicky děti mladší 4 let, vyvíjí se postupně s trombocytopenií, nárůstem blastů a průkazem mutace *GATA1* a trizomie chromozomu 21. Léčba se obvykle zahajuje dříve, než dítě splní kritéria diagnózy AML [5].

### NON-DS AMKL

Akutní megakaryocytární leukémie bez spojení s DS postihuje rovněž velmi malé děti do tří let. U 80 % z nich jsou prokázovány rekurující fúzní geny s velmi odlišným prognostickým významem. Přestavba genu *KMT2A*, fúze *CBFA2T3-GLIS2* či *NUP98-KDM5* jsou pro velmi špatnou prognózu indikací k HSCT v CR1, naopak mutace *GATA1* má excelentní výsledky léčby.

### MUTACE NPM1

Mutace genu nukleofosminu 1 (*NPM1*) se vyskytují u dětí méně často než u do-

spělých, výjimečně u dětí mladších 3 let, s frekvencí 10 % u dětí starších a 20 % u dospívajících. Spojují se s normálním karyotypem, vyšší leukocytózou, častějším nálezem dysplastické krvetvorby, vyšším zastoupením mutací *FLT3*, které na rozdíl od dospělých nezhoršují velmi dobrou prognózu tohoto podtypu AML u dětí.

### MUTACE FLT3

Z mutací tyrosin kinázového receptoru *FLT3* je i u dětí nejčastější *FLT3-ITD*, která se spojuje s normálním karyotypem, leukocytózou a její výskyt stoupá s věkem. Do vysokého rizika s indikací k HSCT v CR1 se zařazuje při výskytu v dominantním klonu, při spojení mutací *WT1* nebo s fúzí *NUP98-NSD1* (3 % AML u dětí).

### KOMPLEXNÍ KARYOTYP

Komplexní karyotyp je nacházen u 10–25 % dětí s AML v závislosti na jeho definici (nejčastěji ≥ 3 strukturální chro-

mozomální změny) a na tom, je-li zahrnut u dětí s prognosticky příznivým genotypem (CBF + AML). Jeho výskyt je vyšší u dětí mladších 3 let než u starších. Na rozdíl od dospělých není v pediatrických studiích jednoznačně spojován s prognózou a není tak většinou kritériem řazení do vysokého rizika. Molekulárně genetická vyšetření mohou u dětí s komplexním karyotypem nacházet prognosticky příznivé aberace.

### KLINICKÉ PROJEVY

Starší děti s monocytární leukémií, hyperleukocytózou ≥ 100×10<sup>9</sup>/l a výraznou hepatosplenomegalií mají vyšší riziko časně smrti na krvácení nebo multiorganové selhání. CNS leukémie (CNS status 3) se vyskytuje u cca 10 % dětí s AML, častěji u malých dětí s monocytární leukémií a dalšími projevy extramedulární leukémie a u inv(16). Ve srovnání s akutní lymfoblastickou leukémií její výskyt není spojen s horší prognózou pacientů, i když je vyšší riziko CNS relapsu.

**Tab. 2. Výsledky léčby vybraných léčebných studií AML u dětí.**

Studijní skupina	Období	Počet pacientů	Časné smrti (%)	CR (%)	EFS (%)	OS (%)
BFM AML 2004	2004–2010	61	2–3	89	55	74
COG AAML0531	2006–2010	1 022	1,8	86,7	53,1	69,4
NOPHO AML2004	2004–2007	151	1,3	97,4	57	69
AIEOP AAML2002	2002–2010	482	3	87	55	68

BFM – konsorcium Německo, Rakousko, Švýcarsko, Česká republika, COG – Children's Oncology Group, USA, NOPHO – konsorcium skandinávských zemí, AIEOP – Itálie

## MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOC

Minimální reziduální nemoc (MRN) lze detekovat průkazem aberantního imunofenotypu blastů průtokovou cytometrií nebo průkazem molekulárních změn polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Každá metoda je úspěšná u cca 80 % pacientů, a jejich kombinací tak lze detekovat MRN prakticky u všech pacientů. Při analýze časné odpovědi na léčbu se jako prognosticky nejvýznamnější jeví výše MRN po 2. indukčním bloku chemoterapie. Děti s MRN  $\geq 10^{-3}$  mají významně vyšší riziko relapsu a nižší přežití do selhání (EFS) a celkové přežití (OS) než děti s mRN nižší a jsou v některých studiích řazeny do vysokého rizika a indikovány k HSCT v CR1. Skutečností ale zůstává, že i děti s nízkou nebo negativní mRN mají riziko relapsu 20–30 % a že u pacientů s prognosticky nepříznivými fúzemi a mutacemi nevypovídá negativní mRN po indukci o prognóze pacienta. Proto některé studie řadí děti do vysokého rizika podle molekulárních změn a nikoli podle mRN.

Monitorování MRN citlivými molekulárními metodami v průběhu konsolidační léčby a po jejím skončení může zachytit progresi MRN ještě v průběhu intenzivní chemoterapie, a indikovat tak pacienta k HSCT v CR1 nebo diagnostikovat molekulární relaps po skončení léčby, a umožnit tak jeho včasnou léčbu a následnou transplantaci. Je třeba mít na paměti, že u CBF + AML a NPM1 + AML může i po skončení chemoterapie přetrvávat nízká hladina MRN

bez prognostického významu. Optimálním schématem monitorování MRN se jeví vyšetření periferní krve v měsíčních intervalech po dobu jednoho roku po skončení léčby. Vzestup MRN v krvi na  $> 5 \times 10^{-4}$  je třeba ověřit novým odběrem krve a kostní dřeně [6]. V léčbě molekulárního relapsu se ověřuje účinnost alternativní léčby, jako je např. kombinace venetoclaxu a azacytidinu.

## LÉČBA AML

AML u dětí se léčí obdobnými schématy jako u dospělých. Základem intenzivní chemoterapie je cytosin arabinosid (AraC) a antracykliny. Dalšími cytostatiky využívanými v léčebných protokolech jsou etoposid, 6-thioguanin a fludarabin. Léčebné protokoly se skládají ze 4–5 bloků chemoterapie, jejich součástí je intratekální aplikace AraC nebo tripletu AraC, metotrexát, kortikoid. Počet intratekálních aplikací se v jednotlivých studiích liší. AraC se v schématech aplikuje v různých dávkách od 100 mg/m<sup>2</sup>/12 hodin až po 3 g/m<sup>2</sup>. U dětí s oblibou využívaný lipozomální daunorubicin DaunoXome umožňující aplikaci vysokých dávek antracyklinů při sníženém riziku výskytu obávané kardiotoxicity ukončil výrobu, a tudíž je v blocích chemoterapie znovu nahrazován daunorubicinem, idarubicinem a mitoxantronem. Německá pracovní skupina BFM dlouhodobě navazovala na intenzivní chemoterapii jeden rok trvající udržovací léčbou složenou z thioguaninu a bloků AraC. Součástí jejich léčebných postupů bylo rovněž profylaktické ozá-

ření krania u všech pacientů. Oba tyto léčebné přístupy jsou již opuštěny [7]. V léčbě dětí s FLT3-ITD se uplatňuje off-label podávaný sorafenib, další inhibitory FLT3 jako např. midostaurin a gilteritinib nemají stanovené dávkování pro děti a studie fáze I a II dosud probíhají.

Publikované výsledky vybraných léčebných studií realizovaných v první dekádě tohoto století jsou uvedeny v tab. 2. Časná smrt postihuje 2–4 % dětí, hematologické remise se daří dosáhnout u 90 % pacientů, smrt v remisi postihuje 3–9 % dětí a její výši ovlivňuje HSCT v CR1. EFS se pohybuje kolem 55 % a pravděpodobnost pětiletého přežití dosahuje 70 %. Relaps postihuje 30 % dětí. Těchto výsledků je dosaženo soustředěním dětí do center se zkušeností v intenzivní léčbě a využitím optimální podpůrné léčby včetně profylaktického podání antimykotik a transfuzí trombo-koncentrátů. V průběhu intenzivní léčby prodělá dítě v průměru 3 infekční epizody, vyžadující včasnou léčbu kombinacemi širokospektrých antibiotik. Optimalizací léčby s využitím inhibitorů FLT3 a HSCT se v probíhajících, dosud nepublikovaných studiích daří zvýšit EFS na 60 % a celkové přežití na 75 %.

Léčba se stratifikuje podle rizika. Děti s APL a mL+DS jsou léčeny samostatnými protokoly. Děti s non-APL, non-DS AML jsou řazeny na základě přítomnosti chromozomálních aberací a časné odpovědi na léčbu do standardního, intermediárního a vysokého rizika. Do standardního rizika jsou řazeny děti s CBF + AML, do vysokého rizika pacienti, kteří nedo-



sáhnou hematologické remise po skončení indukce (~ 5 % dětí), děti s monozomií chromozomu 7 a dle přístupu léčebné studie buď děti s vysokou mRN po skončení indukce, a/nebo děti s prognosticky nepříznivými molekulárními podtypy [3]. Děti řazené do skupiny s vysokým rizikem jsou indikovány k HSCT v CR1, kterou podstoupí 20–25 % dětí s non-APL, non-DS AML [8].

APL standardního rizika (leukocyty  $\geq 10 \times 10^9/l$ ) je i u dětí léčena kombinací all-trans retinoidové kyseliny (ATRA) a arseniku (ATO). Výsledky pediatrických studií ještě nebyly publikovány, ale není důvod očekávat horší výsledky než u dospělých, což znamená, že téměř všichni pacienti jsou touto léčbou vyléčeni. U pacientů vysokého rizika s leukocyty  $\geq 10 \times 10^9/l$  jsou ke kombinaci ATRA + ATO přidány antracykliny, které jsou v kontrolovaných studiích nahrazovány gemtuzumab ozogamicinem. Differenciální syndrom vyvine 20 % dětí, u kterých je nutné včasné podání kortikoidů a hydroxyurey. myeloidní leukémie dětí s Downovým syndromem je mimořádně citlivá vůči AraC, který je podáván s antracykliny v nižších dávkách, než je běžné u dětí bez DS. Přesto je léčba zatížena vyšším rizikem infekčních, zejména virových komplikací. Vyléčit se daří 90 % dětí s mL + DS.

## RELAPS

Nejlepších výsledků léčby relapsu non-APL, non-DS AML dosáhla mezinárodní studie Relapsed AML 2001/01 kombinující fludarabin, AraC a G-CSF (FLAG) s lipozomálním daunorubicinem a prevencí/léčbou CNS leukémie ve dvou blocích, po nichž následovala HSCT v CR2 s přípravnými režimy využívajícími celotělové ozáření a cyklofosfamid nebo kombinaci tří alkylačních agens busulfanu, cyklofosfamidu a melfalanu. Kompletní remise byla dosažena u 64 % dětí, 4leté přežití bylo 38 %. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u relapsů CBF + AML, výsledky léčby časných relapsů do jednoho roku od

diagnózy byly signifikantně horší než relapsů pozdních [9]. Předtransplantační režim busulfan + cyklofosfamid + melfalan je velmi účinný v eradikaci MRN, ale toxický pro děti starší 12 let, kde vedl k neúnosně vysoké mortalitě, a je proto v této věkové kategorii nahrazován kombinací busulfan (nebo treosulfan) + fludarabin + thiotepa.

## POZDNÍ NÁSLEDKY LÉČBY

Děti mají vyšší riziko vývoje pozdních následků než dospělí léčení stejnou léčbou. Výskyt pozdních následků u dětí vyléčených chemoterapií je nízký. Naproti tomu alogenní HSCT zvyšuje výskyt pozdních následků v závislosti na volbě přípravného režimu (vyšší po celotělovém ozáření) a výskytu potransplantační reakce štěpu proti hostiteli s nutností dlouhodobé imunosupresivní léčby. Obávaným pozdním následkem ozáření jsou sekundární maligní nádory, ozáření i busulfan způsobují infertilitu.

## NOVÉ LÉČEBNÉ POSTUPY

Cílená léčba AML je vyvíjena pro dospělé, což znamená, že nemusí být vždy vhodná pro často biologicky odlišné onemocnění dětí. Vzácnost onemocnění u dětí komplikuje organizaci klinických studií nových léků. Perspektivu má rozvíjející se transatlantická spolupráce zaměřená na realizaci studií fáze I/II. V současnosti se u dětí ověřují nové léky již úspěšně používané v léčbě dospělých. Lipozomální přípravek CX-351 kombinuje AraC a daunorubicin v optimálním poměru 5:1, což prodlužuje jeho poločas a usnadňuje absorpci v kostní dřeni. V běhu je studie fáze III iniciální léčby AML u dětí v USA, v Evropě byla zahájena klinická studie u dětí s ML + DS. Gemtuzumab ozogamicin (GO) je imunokonjugát cytostatika kalicheamicinu s monoklonální protilátkou anti-CD33. Molekula CD33 je široce exprimována na leukemických blastech AML. GO je využíván v schématech léčby relapsu AML u dětí, kontrolovaná studie kombinující FLAG s GO ale čeká

již několik let na své zahájení. Naopak v chodu jsou studie fáze I/II kombinující inhibitor BCL-2 venetoclax s vysokými dávkami AraC a hypometylačními léky u dětí s relabující/refrakterní AML. Použití geneticky modifikovaných T lymfocytů s chimérickými antigenními receptory v léčbě dětí s AML čeká na výsledky studií u dospělých. Rozvoj imunoterapie AML je komplikován sdílenou expresí povrchových antigenů na leukemických buňkách i normálních prekurzorech krvetvorby a heterogenitou tohoto onemocnění [10].

## Literatura

1. Bolouri H, Farrar JE, Triche Jr T et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med.* 2018;24:103–112.
2. Hara Y, Shiba N, Yamato G et al. Patients aged less than 3 years with acute myeloid leukaemia characterize a molecularly and clinically distinct subgroup. *Br J Haematol.* 2020;188:528–539.
3. Conneely SE, Rau RE. The genomics of acute myeloid leukemia in children. *Cancer and Metastasis Rev.* 2020;39:189–209.
4. Balgobind BV, Zwaan CM, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011;25:1239–1248.
5. Laurent AP, Kotecha RS, Malinge S. Gain of chromosome 21 in hematological malignancies: lessons from studying leukemia in children with Down syndrome. *Leukemia.* 2020;34:1984–1999.
6. Skou AS, Juul-Damm KL, Ommen HB, Hasle H. Peripheral blood molecular measurable residual disease is sufficient to identify patients with acute myeloid leukaemia with imminent clinical relapse. *Br J Haematol.* 2021. doi: 10.1111/bjh.17449.
7. Rasche M, Zimmermann M, Borschel L et al. Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia.* 2018;32:2167–2177.
8. Hasle H. A critical review of which children with acute myeloid leukaemia need stem cell procedures. *Br J Haematol.* 2014;166:23–33.
9. Kaspers GJL, Zimmermann M, Reinhardt D et al. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the International BFM Study Group. *J Clin Oncol.* 2013;31:599–607.
10. Conneely SE, Stevens AM. Acute myeloid leukemia in children: emerging paradigms in genetics and new approaches to therapy. *Current Oncol Rep.* 2021;23:16.

# Akutní promyelocytární leukémie

Žák P.

IV. interní hematologická klinika FN Hradec Králové  
Katedra interních oborů LF UK Hradec Králové

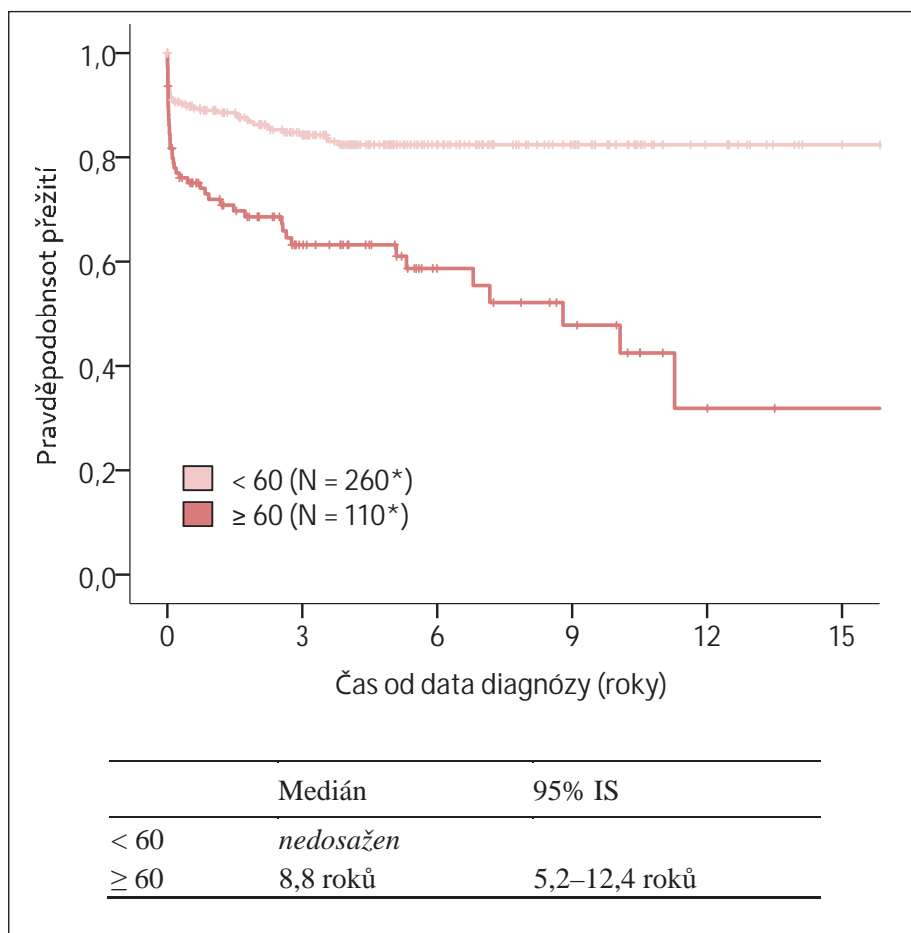
Akutní promyelocytární leukémie (APL) je samostatnou entitou mezi akutními leukémiemi. První popis norského hematologa LK Hillestadta v roce 1957 a později J. Bernarda v roce 1959 ukazuje typické odlišnosti v projevech. Všechny případy jsou provázeny rychlým průběhem, výrazným zmnožením atypických promyelocytů (promyeloblastů) a katastrofickými krvácivými projevy (pozn.: trombotické komplikace jsou méně časté).

Onemocnění je charakterizováno zástavou diferenciací promyelocytů. Patogenetické vysvětlení APL lze najít na úrovni molekulárně genetických změn. Celkem 95 % případů je charakterizo-

váno chromozomální reciproční translokací mezi chromozomy 15 a 17 t(15;17) (q24; q21). Tato změna vede ke vzniku fúzního proteinu PML-RARA (*promyelocytic leukemia – retinoid acid receptor alpha*). Poznatky z výzkumu PML-RARA fúzního proteinu ukázaly, že se nejedná pouze o blok diferenciací na úrovni promyeloblastů, ale současně zabraňuje apoptóze promyeloblastů a umožňuje proliferaci leukemických progenitorů. Aktuálně bylo zachyceno 12 variantních RARA-fúzních genů. Mezi ojedinělé, ale „častěji popsané“ fúzní geny patří *ZBTB16-RARA* a *STAT5b-RARA*, které nejsou citlivé k ATO a ATRA.

V posledních 25 letech došlo k zásadním změnám v léčebném přístupu. Výrazné zlepšení výsledků léčby nastalo po zavedení antracyklinu a z kvalitní podpůrné péče během roku. Úvodní přístup v péči o pacienty s APL je jedním z nejdůležitějších bodů, který ovlivnil celkovou mortalitu na APL. Jak již bylo zmíněno, onemocnění probíhá velmi rychle, proto je při podezření na APL nutná okamžitá hospitalizace ve specializovaných centrech a k případu je vždy přistupováno jako k vysoce rizikové emergentní situaci. Při podezření na APL je na základě charakteristického nálezu v obvodové krvi a kostní dřeni i bez znalosti výsledků genetických vyšetření zahájena terapie s trans-retinovou kyselinou a korekce počtu trombocytů a hladin fibrinogenu.

Pochopení koagulační poruchy je velmi významné pro individuální řízení substituční a případně antikoagulační léčby. Každý případ má do určité míry jinak vyjádřené poruchy a u části pacientů může dominovat primární fibrinolýza nad generací trombinu/fibrinu a naopak nebo se tyto poruchy kombinují. Základní mechanismy jsou dva: 1. APL blasty obsahují velké množství tkáňového faktoru (TF), který je zvýšeně uvolňován do krve. TF aktivuje faktor VII a spouští generaci trombinu a fibrinu. 2. U části pacientů s APL převažuje primární hyperfibrinolýza. APL blasty na svém povrchu silně exprimují annexin II, který vede k aktivaci plazminogenu. Je tedy zřejmé, že neexistuje univerzální doporučení, ale léčebný postup je nezbytné indikovat individuálně dle charakteru probíhající poruchy. Mimo standardní spektrum odběrů je nutné pravidelné monitorování hemokoagulace, především při zahájení a v průběhu



Graf. 1. Celkové přežití – dle věku.

indukční terapie. Včasné zahájení podání ATRA může výrazně snížit závažnost krvácivých komplikací.

Další významnou změnou bylo zavedení tzv. diferenciacních léků, a to trans-retinové kyseliny (ATRA) a přibližně o 10 let později oxidu arsenitého (ATO). Tyto dva léky mají odlišný mechanismus, kterým indukují degradaci PML-RARA a navozují remisi onemocnění. Jejich působení je synergické. Provedené studie, které podávaly kombinaci ATO + ATRA, prokázaly prodloužení celkového přežití s nižší frekvencí relapsu ve skupině nízké a středně rizikových APL. Pro skupinu vysoce rizikových pacientů s počtem leukocytů  $> 10 \times 10^9/l$  je podáván obvykle antracyklin v kombinaci s ATRA nebo méně často chemoterapie v kombinaci s ATRA + ATO. Až u 70 % pacientů ve skupině s nízkým a středním rizikem léčených kombinací ATO + ATRA dochází k leukocytóze, která může být provázena diferenciacním syndromem. Z tohoto důvodu je při vzestupu leukocytů  $> 10 \times 10^9/l$  podávána hydroxyurea nebo idarubicin nebo gentuzumab ozogamicim. Při rozvoji závažnější formy diferenciacního syndromu je nezbytné přechodné přerušení diferenciacní léčby

a nasazení kortikosteroidů (obvykle 10 mg dexamethazonu 2x denně). K navození molekulárně genetické remise po 4 týdnech terapie ATO-ATRA dochází obvykle u 63 % léčených, což neznamená selhání léčby. K plnému navození molekulárně genetické remise obvykle dochází po 8–10 týdnech léčby. Po podání konsolidační terapie u pacientů léčených pouze kombinací ATO + ATRA není potřebná udržovací terapie. Udržovací terapie je naopak vhodná, pokud byla podána konvenční indukční a konsolidační terapie (chemoterapie + ATRA).

Celkové léčebné výsledky reportované ze studií ukázaly celkové přežití u nízké a středně rizikové skupiny pacientů v rozmezí 86–99 % ve 4 letech od diagnózy, ve skupině vysoce rizikových APL bylo reportováno celkové přežití 86 % po 5 letech od diagnózy. Přibližně u 10–20 % dochází k relapsu onemocnění.

Data za ČR byla získána z databáze CELL – DATOOL. V souboru bylo analyzováno 376 pacientů s APL (264 pacientů  $< 60$  let; 112 pacientů  $\geq 60$  let) ze všech center vysoce specializované hematologické péče v ČR. V obou věko-

vých skupinách (nad i pod 60 let) byla podávána kurativní léčba (96,9 a 94,5 % pacientů). Převažovala skupina pacientů léčených kombinací chemoterapie a ATRA (dle AIDA nebo PETHEMA protokolu). Od roku 2020 narůstá počet léčených pacientů v nízkém a středním riziku bez chemoterapie pouze kombinací ATO + ATRA. Diagnostika byla dominantně opřena o výsledky průkazu fúzního genu PML-RARA, klasické cytogenetické vyšetření a FISH nebylo provedeno nebo se nezdařilo u 28,7 % pacientů. Ve skupině  $< 60$  let nebyl medián celkového přežití dosažen, ve skupině  $\geq 60$  let byl medián celkového přežití 8,8 roku (graf. 1).

### Literatura

- Sanz MA et al. Management of acute promyelocytic leukemia: update recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. doi: [org/10.1182/blood-2019-01-894980](https://doi.org/10.1182/blood-2019-01-894980).
- Mantha S et al. Predictive factors of fatal bleeding in acute promyelocytic leukemia. doi: [10.1016/j.thromres.2018.01.038](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.01.038).
- Osman AEG et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia in Adults doi: [10.1200/JOP.18.00328](https://doi.org/10.1200/JOP.18.00328).
- Jimenez JJ et al. Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature. *Oncotarget*, 2020;11(11):992–1003.

## Nové předpisy IVDR a jejich vliv na diagnostickou praxi v hematologii

Kalina T., Kanderová V.

*Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol*

Dne 26. května 2022 vchází v platnost nové nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro (IVDR 2017/746/EU), které výrazně reguluje in vitro diagnostiku (IVD) ve všech členských státech EU. Na toto nařízení reaguje česká legislativa tvorbou nových zákonů o IVD, text nařízení IVDR 2017/746/EU ale měnit nesmí.

V edukační přednášce bude poskytnut obecný přehled nové legislativy o IVD na úrovni evropské i české, účel nařízení IVDR 2017/746/EU, termíny platnosti a přechodných období a nový klasifikační systém in vitro diagnostik.

Dále se zaměříme na praktickou přípravu zdravotnických laboratoří na zavedení IVDR 2017/746/EU a na hledání

současných CE-IVD variant vyšetření, na validace a verifikace používaných in vitro diagnostik a nároky na dokumentaci a na soulad IVDR 2017/746/EU s normou ČSN EN ISO 15189.

Poskytneme i náhled do problematiky tzv. in house testů včetně stanoviska odborných společností České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně.

## Genetické testování vrozených trombotických a krvácivých stavů a personalizace léčby poruch hemostázy

Hrachovinová I.

*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

Genetické testování v diagnostice poruch hemostázy má velmi dlouhou historii, sahá do konce 80. let minulého století. Její brzké zavedení bylo podmíněno tím, že většina onemocnění, která se projevují jako porucha hemostázy (krvácení, trombózy), je monogenní. K dnešnímu dni je prověřeno 91 genů, které jsou příčinou trombotických nebo krvácivých stavů. Zavedení genetického testování urychlila také potřeba zjišťovat přenašečství hemofilie a prenatalní diagnostika hemofilie. Genetické testování poruch hemostázy bylo umožněno znalostí jednotlivých genů, které kódují vrozené deficity a zavedením sekvenčních metod od Sangerova sekvenování přes exomové sekvenování až k celogenomovému sekvenování.

Genetické testování není nikdy první v pořadí laboratorních vyšetření. Exis-

tuje doporučený algoritmus, který by se měl dodržovat. U pacientů s trombotickými nebo krvácivými problémy je vždy první klinická diagnóza, následuje komplexní důkladné laboratorní vyšetření a na základě jeho výsledků je indikováno genetické vyšetření. Žádný z kroků nesmí být vynechán.

V klinické části jsou např. velmi důležité informace o síle a typu krvácení, rodinném výskytu, pohlaví postižených rodinných příslušníků, věku objevení krvácivých příznaků, typu trombózy, věku první trombózy, koincidence vnějších příčin atd. V laboratorní části je důležitá komplexnost a kompletnost vyšetření podle moderních doporučení. Například není možné rozhodnout, že pacient má hemofilii A pouze podle vyšetření FVIII nebo že příčinou trombofilie pacienta je jen FV Leiden a dál nevyšetřovat nic,

když může mít ještě mnohem závažnější trombofilní rizikový faktor, např. deficit antitrombinu (AT).

Metodika genetického testování se volí podle cíle, který očekáváme, podle rychlosti, s jakou musí být zjištěn výsledek, a také podle fenotypu pacienta. V dnešní době máme možnost volit mezi Sangerovým sekvenováním, exomovým sekvenováním nebo celogenomovým sekvenováním, samozřejmě nezbytnou součástí vyšetření je skrínig velkých delecí a insercí metodou MLPA. U některých onemocnění, např. u těžké hemofilie A, je zvláštní postup – začíná se skrínigem inverzí v genu pro F8. U některých onemocnění se vyskytují delecce i bodové mutace (např. TTP, def.PS, def. FVII). Genetické testování není jen laboratorní rutinou, je vždy důležité, aby měli pracovníci hlubší znalosti o daném one-

mocnění, protože každý genetický výsledek je nutné posoudit vzhledem k fenotypu pacienta.

Proč a kdy geneticky testujeme:

1. Chceme ověřit klinickou diagnózu:
  - Fenotypické laboratorní testování není jednoznačné (kombinovaný deficit několika faktorů-např. FVIII a FV, hraniční hodnota VWF atd.).
  - Pod jedním fenotypem existuje několik genotypů (např. hemofilie A a VWCH).
2. Došetření rodiny (v. vyšetřování přenašečství mutace):
  - Prenatální diagnostika.
  - Preimplantační diagnostika.
  - Vyšetření přenašečství (např. hemofilie).
  - Vyšetření rodinného výskytu mutace pro prevenci krvácení nebo trombózy.
3. Personalizace léčby nebo její větší efektivita:
  - Prevence vzniku inhibitoru FVIII/IX. Léčba těžkých hemofiliků se přizpůsobuje typu kauzální mutace, protože je známo, že některé mutace mají vyšší riziko vzniku inhibitoru.
  - Zlepšení efektivity léčby. U pacientů s vrozeným deficitem AT se přizpůsobuje typ antikoagulační léčby

typu mutace v genu pro AT. U pacientů s VWCH typu 2 se přizpůsobuje typ léčby subtypu (např. léčba DDAVP je kontraindikována u subtypu 2B).

4. Výzkum u nejasné laboratorní patologie:
  - Pochopení patologie nemoci. Například vysvětlení, proč se některé dysfibrinogenemie projevují krvácením a jiné trombózami.
  - Nalezení nových souvislostí u klinicky pozitivních nemocí, ale bez zjevné jasné patologie laboratorních výsledků.

### PROBLÉMY S GENETICKÝM TESTOVÁNÍM

Cena genetického vyšetření stále klesá, největší náklady (finanční i intelektuální) jsou s nastavením metodiky. Je nutné rozmyslet, jaká vyšetření a do jaké šíře budou prováděna. Rozhodnout se, zda vyšetřovat více genů společně ES nebo jednotlivé geny Sangerovým sekvenováním, případně, zda se vyplatí celogenomové sekvenování.

Dostupnost genetického vyšetření poruch hemostázy by měla být v rámci jedné republiky, protože genetické varianty jsou často vázány na jeden národ (oblast).

Vyšetření by mělo být prováděno v erudované laboratoři zaměřené na genetické testování poruch hemostázy. Laboratoř by měla být zařazena do EKK genetického vyšetřování poruch hemostázy (např. UK NEQAS).

Interpretace je velmi často problematická, zvláště u neznámých záměn. Pro verifikaci mutace často musí být rozšířen skrínig i na rodinné příslušníky.

Z etického hlediska je důležité si uvědomit, že každému vyšetření by měla předcházet konzultace s lékařem, který pacientovi vysvětlí důvod genetického vyšetření (např. prenatální vyšetření, rodinný skrínig) a následně vysvětlí závažnost a dopad genetického výsledku.

### Literatura

- Bastda et al. Diagnosis of inherited coagulation and bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(7):695–707.
- Megy J et al. Curated disease-causing genes for bleeding, thrombotic, and platelet disorders: Communication from the SSC of the ISTH. *JTH.* 2019;17(8):1253–1260.
- Lillicrap D. Molecular testing for disorders of hemostasis. *Int.J Lab Hematol.* 2013;35(3):290–296.
- Castaman and Matino, Hemophilia A and B: molecular and clinical similarities and differences. *Haematologica.* 2019;104(9):1702–1709.
- Ver Donck F, Downes K, Freson K. Strengths and limitations of high-throughput sequencing for the diagnosis of inherited bleeding and platelet disorders. *JTH.* 2020;18:1839–1845.

## Klonální evoluce CLL – význam BCR receptoru a abnormalit genu *TP53*

Pospíšilová Š., Malčíková J., Pavlová Š., Plevová K., Stránská K., Kunt-Vonková B., Závacká K., Kotašková J., Brychtová Y., Panovská A., Mašlejová S., Němcová L., Doubek M., Mayer J.

<sup>1</sup> Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN Brno

<sup>2</sup> Centrum molekulární medicíny, Středoevropský technologický institut, MU, Brno

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je klinicky i geneticky heterogenní onemocnění se střídáním období remisí a relapsů. Mezi rutinně vyšetřované prognostické a prediktivní markery patří výskyt somatických hypermutací ve variabilní oblasti těžkého řetězce imu-

noglobulinového genu (IGHV), del(17p), del(11q), +12, del(13q14) a mutace v genech *TP53*, *BTK* a *BCL* [1–3]. Opakovaná vyšetření těchto markerů i dalších genomických změn studovaných v rámci výzkumných projektů umožňují sledovat klonální evoluci ve vztahu k primární pa-

togenezi onemocnění i různým terapeutickým režimům.

CLL vzniká maligní transformací diferencovaného B-lymfocyty. Fyziologické B-lymfocyty jsou charakteristické širokým spektrem variant B-buněčného receptoru (BCR) kódovaných přestavě-

nými geny pro těžký (IGH) a lehký (IGK/L) řetězec imunoglobulinu (IG) se somatickými hypermutacemi IGHV. Populace CLL lymfocytů je obecně považována za klon buněk s identickou přestavbou IG a sekvencí IGHV. Přesto jsou při zachytu některých pacientů s CLL identifikovány dva nebo více klonů s produktivními přestavbami [4], CLL se tedy může rozvinout na podkladě více paralelních expanzí B-lymfocytů. To potvrzují i výsledky získané analýzou jednotlivých buněk [5] (*single cell analysis*), které dokládají přítomnost několika klonů B-lymfocytů i u pacientů s jednou, imunofenotypicky zdánlivě homogenní, populací CLL lymfocytů. Méně agresivní klony definované na základě unikátních kombinací IGH a IGK/L jsou často následně eliminovány na úkor klonů nesoucích nemutovaný IGHV a/nebo prognosticky nepříznivé aberace.

Populace CLL lymfocytů jednoho pacienta charakteristická kombinací IGH a IGK/L je typicky tvořena několika subklony s různými genovými mutacemi a cytogenetickými aberacemi. Opakovaná analýza těchto defektů v průběhu onemocnění ukazuje, že poměr jednotlivých subklonů se může měnit i v období bez léčby [6], avšak terapie představuje zásadní selekční tlak upřednostňující více agresivní a/nebo rezistentní klony. Tyto klony mohou být před léčbou nedetekovatelné rutinními metodami nebo mohou vznikat až v průběhu léčby. Léčba chemoimunoterapií, na kterou pacienti s defekty *TP53* odpovídají špatně, zásadně zvýhodňuje malé klony s defekty

genu *TP53* [7–10]. Tyto klony pak v relapsu často expandují a následně zkracují dobu přežití pacientů. Pokud k selekci klonů s defektem *TP53* nedochází ani v případě opakované léčby u relabujících pacientů, příčinou může být přítomnost mutací v jiných CLL-asociovaných genech, jež můžeme nalézt pomocí celo-exomového sekvenování. Inhibitory dráhy BCR a proteinu bcl-2 jsou naopak účinné i u pacientů s defekty *TP53*. V souladu s tím se selekční výhoda malých klonů s defekty *TP53* ztrácí a v progresi onemocnění nalézáme změny způsobující rezistenci na cílenou léčbu, jako jsou mutace v *BTK*, *PLCG2* a *BCL2* [11–13].

Studium klonální evoluce hematologických onemocnění přispívá k objasnění vlivu selekčního tlaku terapie na klonální heterogenitu onemocnění. Tyto výsledky se pak uplatňují v klinické praxi při volbě nejvhodnější léčby. Takto je možné předcházet nežádoucí klonální evoluci a vzniku agresivnějšího rezistentního onemocnění, což v konečném důsledku vede k prodloužení přežití a zlepšení kvality života pacientů s CLL.

### Grantová podpora

Podpořeno projekty: MZCR-RVO 65269705, MUNI/A/1595/2020, MUNI/IGA/1640/2020.

### Literatura

1. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745–2760.
2. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, et al. ERIC recommendations for *TP53* mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on me-

thodological approaches and results interpretation. *Leukemia*. 2018;32(5):1070–1080.

3. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2021;32(1):23–33.
4. Plevova K, Francova HS, Burckova K, et al. Multiple productive immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in chronic lymphocytic leukemia are mostly derived from independent clones. *Haematologica*. 2014;99(2):329–338.
5. Brazdilova K, Plevova K, Skuhrova Francova H, et al. Multiple productive IGH rearrangements denote oligoclonality even in immunophenotypically monoclonal CLL. *Leukemia*. 2018;32(1):234–236.
6. Hernández-Sánchez M, Kotaskova J, Rodríguez AE, et al. CLL cells cumulate genetic aberrations prior to the first therapy even in outwardly inactive disease phase. *Leukemia*. 2019;33(2):518–558.
7. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of *TP53* mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):877–885.
8. Malcikova J, Pavlova S, Kunt Vonkova B, et al. Low-burden *TP53* mutations in CLL: Clinical impact and clonal evolution within the context of different treatment options. *Blood*. 2021.
9. Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al. Clinical impact of small *TP53* mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(14):2139–2147.
10. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525–530.
11. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014;370(24):2286–2294.
12. Furman RR, Cheng S, Lu P, et al. Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(24):2352–2354.
13. Blombery P, Anderson MA, Gong JN, et al. Acquisition of the recurrent Gly101Val mutation in *BCL2* confers resistance to venetoclax in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Discov*. 2019;9(3):342–353.

# Molekulární diagnostika MDS – dopad alelových variant *TP53* na průběh onemocnění

Beličková M.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

## ÚVOD

Myelodysplastické syndromy (MDS) zahrnují heterogenní skupinu myeloidních novotvarů, které se vyznačují selháním kostní dřeně s abnormální morfologií buněk a vysokým rizikem progresu do akutní myeloidní leukémie (AML). MDS, stejně jako jiné druhy rakoviny, vzniká akumulací mutací a dalších genetických změn založených na postupných vlnách klonální selekce. Na patogenezi nemoci se též podílí prostředí kostní dřeně a vnější faktory, jako jsou autoimunita a chemoradioterapie.

## GENETICKÉ ABNORMALITY

Přibližně u 50 % pacientů MDS jsou detekovány cytogenetické abnormality, a to převážně nevyvážené přestavby, které vedou k ztrátě či zisku chromozomálního materiálu. Mezi nečastější patří  $-7/\text{del}(7q)$ ,  $-5/\text{del}(5q)$ ,  $\text{del}(20q)$ ,  $+8$  a  $+21q$ . Mnoho z těchto aberací se často vyskytuje jako součást komplex-

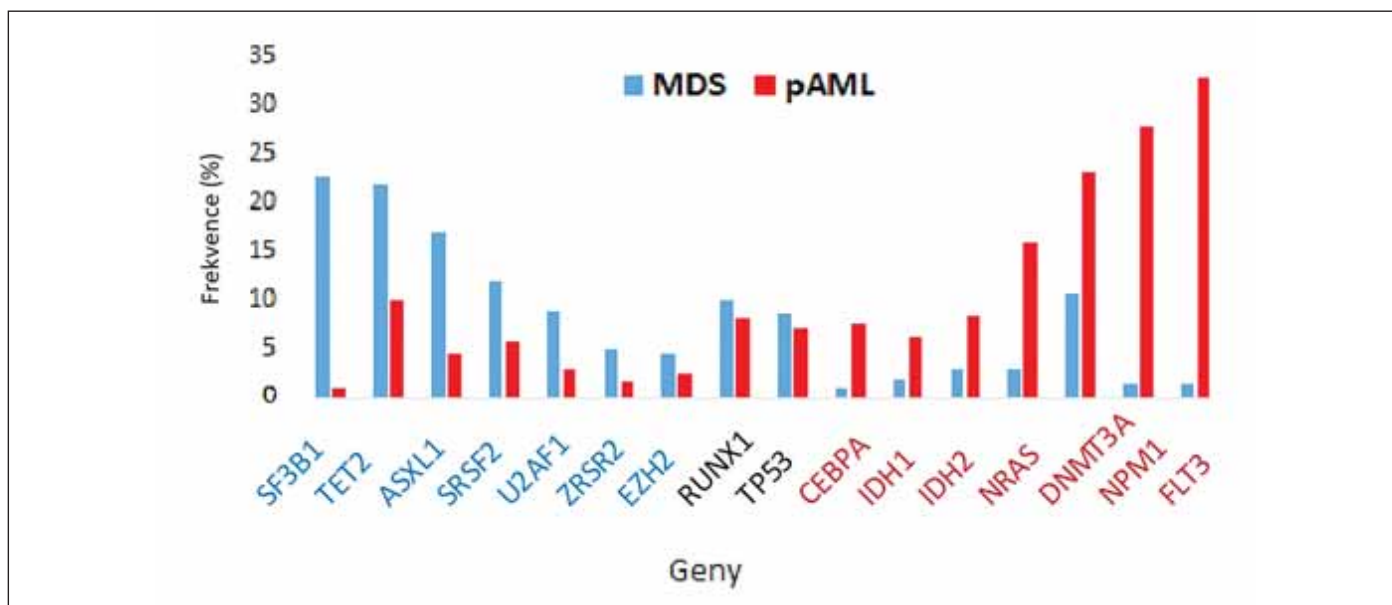
ních abnormalit, označovaných jako komplexní karyotyp (CK), kdy je zachyceno více jak ( $\geq 3$ ) chromozomálních změn. Kromě toho u 80–90 % MDS pacientů jsou identifikovány rekurentní somatické mutace ve více než 50 genech.

Nejčastěji detekované mutace u MDS jsou v genech zapojených do sestřihu RNA (např. *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) a epigenetických modifikací, jako jsou modifikace histonů (např. *ASXL1*, *EZH2*) a metylace DNA (např. *TET2*, *DNMT3A*, *IDH1 / IDH2*). Dále se mutace vyskytují v genech pro DNA transkripci (např. *RUNX1*, *TP53*), signální transdukci (např. *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*) a kohezinový komplex (např. *SMC3*, *SMC1A*, *RAD21*, *STAG2*). Spektrum mutovaných genů není specifické jen pro MDS, ale překrývá se s geny mutovanými také u primární AML, což naznačuje společné patogenní mechanismy. Frekvence jednotlivých mutací se však mezi onemocněními významně liší (obr. 1). Světová zdravotnická orga-

nizace (WHO) v roce 2016 aktualizovala svá klasifikační kritéria pro MDS a zařadila detekci mutace v genu *SF3B1* jako součást diagnostických kritérií pro MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS). Nejběžnější geny s rekurentními somatickými mutacemi u MDS jsou uvedeny v tab. 1.

## KLONÁLNÍ HEMATOPOÉZA

Je též nutné se zmínit, že v průběhu lidského života dochází i ve zdravých tkáňích k hromadění somatických mutací DNA, a v případě, že progenitorová hematopoetická buňka získá jednu nebo více somatických mutací, které jí poskytnou konkurenční výhodu nad ostatními buňkami, může dojít k progresivní expanzi klonu a vzniku klonální hematopoézy (CH). Výskyt CH stoupá s věkem (u 10% populace starší 70 let) a v případě, že jedinci s CH nesplňují kritéria WHO pro hematologickou malignitu, mluvíme o tzv. klonální hematopo-



Graf 1. Vývoj vybraných laboratorních parametrů v čase – období 2014–2019.

éze neurčitého potenciálu (CHIP). Nejčastěji mutované geny spojené s CHIP jsou *DNMT3A*, *TET2* a *ASXL1*, označované také zkratkou geny DTA. CHIP je spojen se zvýšeným rizikem vzniku hematologické malignity a kardiovaskulárního onemocnění.

## PROGNOSTICKÉ MODELY

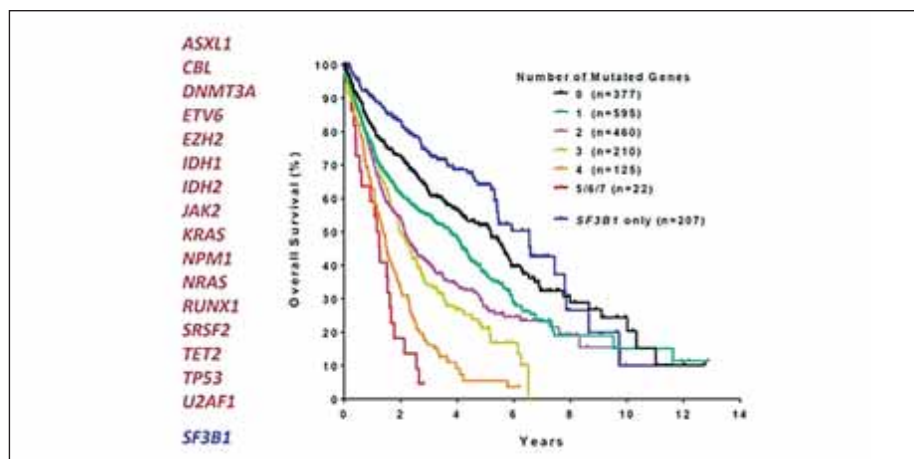
Stratifikace rizika u pacientů s MDS již řadu let dominantním výzkumným cílem a bylo navrženo mnoho prognostických modelů, z nichž nejběžnější je mezinárodní prognosticky-skórovací systém IPSS a jeho revidovaná verze IPSS-R. Již několik let je snaha začlenit do stratifikace rizika též genomickou analýzu, která, jak se ukazuje, může upřesnit prognózu MDS. Implementace molekulárních informací není však jednoduchá. Je třeba zohlednit typ mutace (například missense vs. nonsense), umístění mutace v genu a frekvenci variantních alel (VAF). Často se u pacienta nevyskytuje pouze jedna mutace, ale pacient nese více mutací a musí se počítat se vzájemným překrýváním účinků detekovaných mutací. Právě na vytvoření IPSS-Rm, tedy implantaci molekulárních znaků do skórovacího systému, již nějaký čas pracuje mezinárodní pracovní skupina pro prognózu MDS. Detailní výsledky se očekávají již brzy. Nicméně již nyní je zřejmé, že se zvýšeným celkovým přežitím (OS) byla spojena pouze jedna mutace, a to samostatně vyskytující se v genu *SF3B1*. Naopak mutace v ostatních genech OS snižují, a to s každou další detekovanou mutací (obr. 2). Výsledky různých publikovaných studií se často překrývají a bylo identifikováno několik specifických mutací, které silně korelují s OS a přežitím bez progresu (PFS), z nichž nejvýznamnější jsou mutace v genech *EZH2*, *RUNX1* a *TP53* pro všechny pacienty MDS a navíc pro MDS pacienty s < 5% blastů i v genech *ASXL1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *NRAS* a *IDH2*.

## TP53

Zcela samostatnou kapitolu tvoří mutace v tumor supresorovém genu *TP53*,

**Tab. 1. Seznam nejčastěji mutovaných genů u MDS u MDS.**

Gen	Frekvence (%)	Umístění	Funkce
SF3B1	20–30	2q33	Sestřih RNA
TET2	20–30	4q24	Metylce DNA
ASXL1	15–20	20q11	Modifikace histonů
SRSF2	~ 15	17q25	Sestřih RNA
DNMT3A	~ 10	2p23	Metylce DNA
RUNX1	~ 10	21q22	Transkripční faktor
TP53	5–10	17p13	Tumor supresorový gen
U2AF1	5–10	21q22	Sestřih RNA
EZH2	5–10	7q36	Modifikace histonů
ZRSR2	5–10	X chromozom	Sestřih RNA
STAG2	5–7	X chromozom	Kohezinový komplex
NRAS	~ 5	1p13	Signální transdukce
CBL	~ 5	11q23	Signální transdukce
IDH1/IDH2	~ 5	2q33/15q26	Metylce DNA
BCOR	~ 5	X chromozom	Transkripční faktor



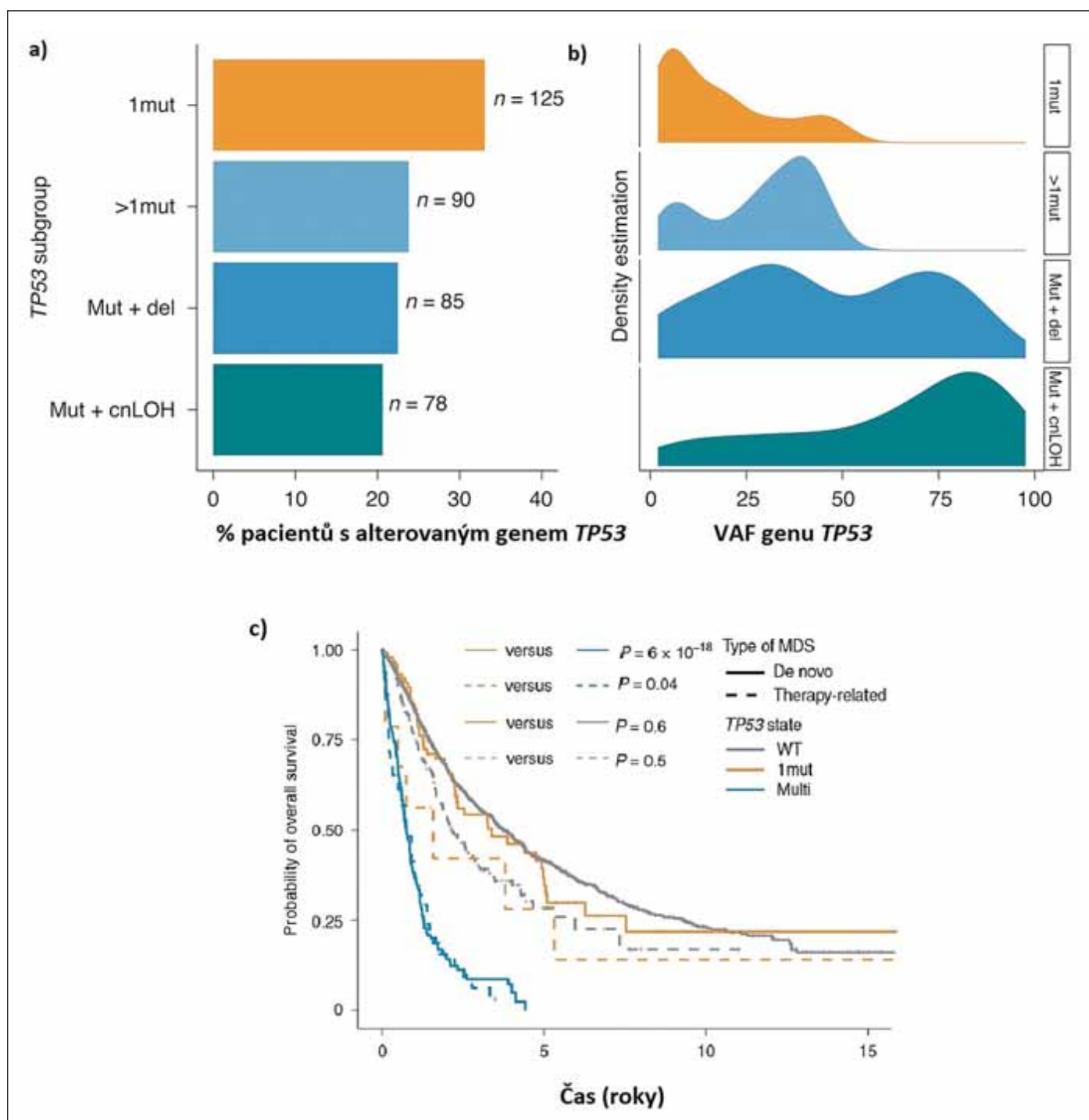
**Obr. 2. Kaplan-Meierovy křivky přežití pro pacienty s MDS rozdělené podle počtu zjištěných mutací a mutací pouze v genu *SF3B1*. Pacienti se samostatnou mutací v genu *SF3B1* mají nejdéší OS a naopak pacienti s 5 a více mutacemi mají nejkratší OS (upraveno podle Bejar R, MDS Foundation).**

který je jeden z nejčastěji mutovaných genů u nádorových onemocnění. Z předchozích studií je známo, že mutace *TP53* se nachází přibližně u 20–25 % MDS pacientů s vysokým rizikem a bývá spojena s komplexním karyotypem. Zároveň u pacientů s nízkým rizikem bývá detekována jen u 10 % a z toho u 25 % pacientů s del (5q).

Mezinárodní pracovní skupina pro prognózu MDS, jejíž jsme součástí, vyhodnotila mutační stav tohoto genu spolu s delecemi a počty kopií v kohortě

3 324 dosud neléčených MDS pacientů. U 11 % pacientů byla diagnostikována mutace v tomto genu, z čehož 1/3 pacientů měla pouze monoalelickou mutaci. U zbývajících 2/3 pacientů bylo detekováno více zásahů. A to buď více mutací nebo jedna mutace kombinovaná s delecí či mutace kombinovaná s cnLOH (kopii neutrální ztráta heterozygoty), jak je znázorněno na obr. 3. Studie ukázala, že multi-hitový stav u MDS, ne samotná přítomnost jakékoli mutace *TP53*, je spojen se špatnou prognózou,





Obr. 3. Mutace a alelické imbalance v genu TP53 u MDS pacientů. a) Rozdělení pacientů s mutací v genu TP53 do 4 skupin podle mono- a multi-alelického stavu. První skupinu tvoří pacienti pouze s jednou mutací, druhou skupinu s více jak jednou mutací, třetí skupinu pacienti s mutací a zároveň s delecí na příslušném lokusu a čtvrtou skupinu pacienti s mutací a cnLOH. b) Vyjádření % VAF mutací TP53 napříč podskupinami. c) Celkové přežití MDS pacientů rozdělených dle mutačního stavu TP53 [upraveno podle 10].

rychlou transformací do AML a s nestabilitou genomu.

### ZÁVĚR

Nové technologie umožnily mnohem přesnější genomickou analýzu

MDS a odhalily, že genetický profil pacienta ovlivňuje klinický fenotyp, prognózu a odpověď na terapii. Proto vytvořením nového komplexního genomicko-klinického modelu pro prognózu se zpřesní doposud užívané

modely, které se přiblíží k osobní predikci.

### Grantová podpora

Práce byla podpořena grantem AZV NV 18-03-00227.

## Literatura

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391–2405.
2. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364:2496–2506.
3. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: From clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 2017;17:5–19.
4. Bejar R, Greenberg PL. The Impact of Somatic and Germline Mutations in Myelodysplastic Syndromes and Related Disorders. *J. Natl. Compr. Cancer Netw*. 2017;15:131–135.
5. Ogawa S. Genetics of MDS. *Blood*. 2019;133:1049–1059.
6. Nagata Y, Maciejewski JP. The functional mechanisms of mutations in myelodysplastic syndrome Leukemia. 2019;33:2779–2794.
7. Rio-Machin A, Vulliamy T, Hug N et al. The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. *Nat. Commun*. 2020;11:1–12.
8. Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Blood Adv*. 2018;2:3404–3410.
9. Belickova M, Vesela J, Jonasova A et al. TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016;14;7(24):36266–36279.
10. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med*. 2020;26(10):1549–1556.

# Ribozomopatie: hematologická onemocnění s ribozomální dysfunkcí

Pospíšilová D.

Dětská klinika FN Olomouc

## ROLE RIBOZOMŮ V ORGANIZMU

Ribozomy jsou ribonukleoproteiny nazývané také „proteosyntetickými továrnami“ buněk. Jsou nemembránovými organelami složenými z větší a menší podjednotky, na jejichž stavbě se podílí bílkoviny a ribozomální RNA. Nacházejí se ve vysokých počtech v cytoplazmě všech známých buněk, u eukaryot také na povrchu hrubého endoplazmatického retikula. Probíhá na nich čtení genetického kódu ve všech buňkách.

Ribozomy jsou formovány nejprve v jádře buněk, jejich prekurzory ve formě velké (60S) a malé (40S) ribozomální podjednotky jsou transportovány do cytoplazmy, kde probíhá závěrečná fáze jejich maturace: spojení obou podjednotek ve funkční ribozom, který je základem buněčné funkce a zajišťuje syntézu bílkovin. Produkce ribozomů v buňce a tvorba bílkovin jsou úzce koordinovány s cílem zajištění požadavků na syntézu bílkovin spojených s růstem a množením buněk. Probíhá na nich tzv. translace, při níž je z řetězce RNA podle matrice mRNA syntetizován polypeptid. Správná funkce ribozomů je nezbytná pro přežití organismů.

V eukaryotické buňce jsou procesy transkripce a translace odděleny místně i časově: DNA se nachází v buněčném jádře, kde je také přepisována, avšak translace zralé mRNA, která opustí jádro, se následně odehrává v cytoplazmě buňky. Molekuly RNA mohou mít nejen informační, ale i katalytickou funkci. Translace je zajištěna komplexem složeným z ribozomální RNA (rRNA) a ribozomu, který postupuje po molekule mRNA a dle jejího templátu polymerizuje aminokyseliny, přicházející ve

vazbě s tRNA (transferová RNA). Vzniká tak polypeptidový řetězec, který dozraje ve funkční protein. Syntéza a zpracování mRNA v průběhu biosyntézy ribozomu je energeticky a časově náročným procesem, zajištěným řadou regulačních mechanismů i v cytoplazmě, především hospodařením s mRNA, frekvencí a průběhem její translace obecně nebo selektivně. Různé stupně regulační úrovně nabývají významné role zejména již v průběhu embryogeneze, kde hraje klíčovou roli již nasyntetizovaná rezerva mRNA. Důležitou roli hrají i v situacích vyžadujících rychlou specifickou reakci na konkrétní externí podmínky, ať se jedná o běžné změny podmínek, či o akutní reakci na ohrožení a poškození tkání.

Poslední výzkumy ukazují, že **biogeneze ribozomů není pouze podstatným regulátorem růstu a množení buněk, ale zasahuje i do buněčného metabolismu.**

Odhalení specifických poruch v procesu produkce ribozomu vedlo ke vzniku **nové heterogenní skupiny poruch**, které jsou charakterizované různým typem postižení ribozomální funkce mohou být spojené se zvýšeným rizikem vzniku maligního onemocnění. Tato onemocnění jsou dnes souhrnně označována jako **ribozomopatie**. Tento termín je v hematologii používán od roku 1999.

**Ribozomopatie** vznikají v důsledku specifických změn v procesu produkce ribozomu, nebo se na jejich vzniku může podílet řada jiných buněčných mechanismů, mohou mít tedy multifaktoriální patogenезi. Specifické faktory zasahující do biogeneze ribozomů mohou hrát roli pouze v biogenezi ribozomu nebo mít

další extra-ribozomální funkce, proto není snadné připsat patogenезi jednotlivých nemocí pouze změnám ribozomální biogeneze, i když tato je jednoznačně ovlivněna nejvýrazněji. Mutace genů kódujících ribozomální proteiny mohou tedy zasáhnout do různých fází procesu tvorby ribozomů a vedou ke vzniku řady různorodých tkáňově specifických onemocnění. Každé z těchto onemocnění je spojeno se specifickými defekty v biogenezi ribozomů, které způsobují typický klinický fenotyp, nejčastěji selhání kostní dřevě a/nebo kraniofaciální či jiné anomálie skeletu.

## VROZENÉ RIBOZOMOPATIE

Termín ribozomopatie s odpovídajícím významem byl poprvé navržen pro syndrom charakterizovaný v roce 1999: **Dyskeratosis congenita (X-DC)**, jehož patologické charakteristiky vznikají **v důsledku mutací genu pro dyskerin-pseudouridinsyntázu**. Dyskerin mimo své další funkce zprostředkovává modifikaci přibližně 100 specifických uridinových zbytků na pseudouridiny v rRNA, což je základní krok ribozomální biogeneze. Vzápětí byla popsána první „čistá“ ribozomopatie s mutacemi genu kódujícího vlastní ribozomální protein: **Diamond-Blackfanova anémie**.

### Diamond-Blackfanova anémie (DBA)

DBA byla prvním onemocněním v humánní medicíně, které je způsobeno přímo mutacemi genů pro ribozomální proteiny. Po desetiletích snahy o nalezení příčiny DBA byla teprve v roce 1999 odhalena její genetická podstata: překvapivý nález heterozygotní mutace genu kódujícího ribozomální protein

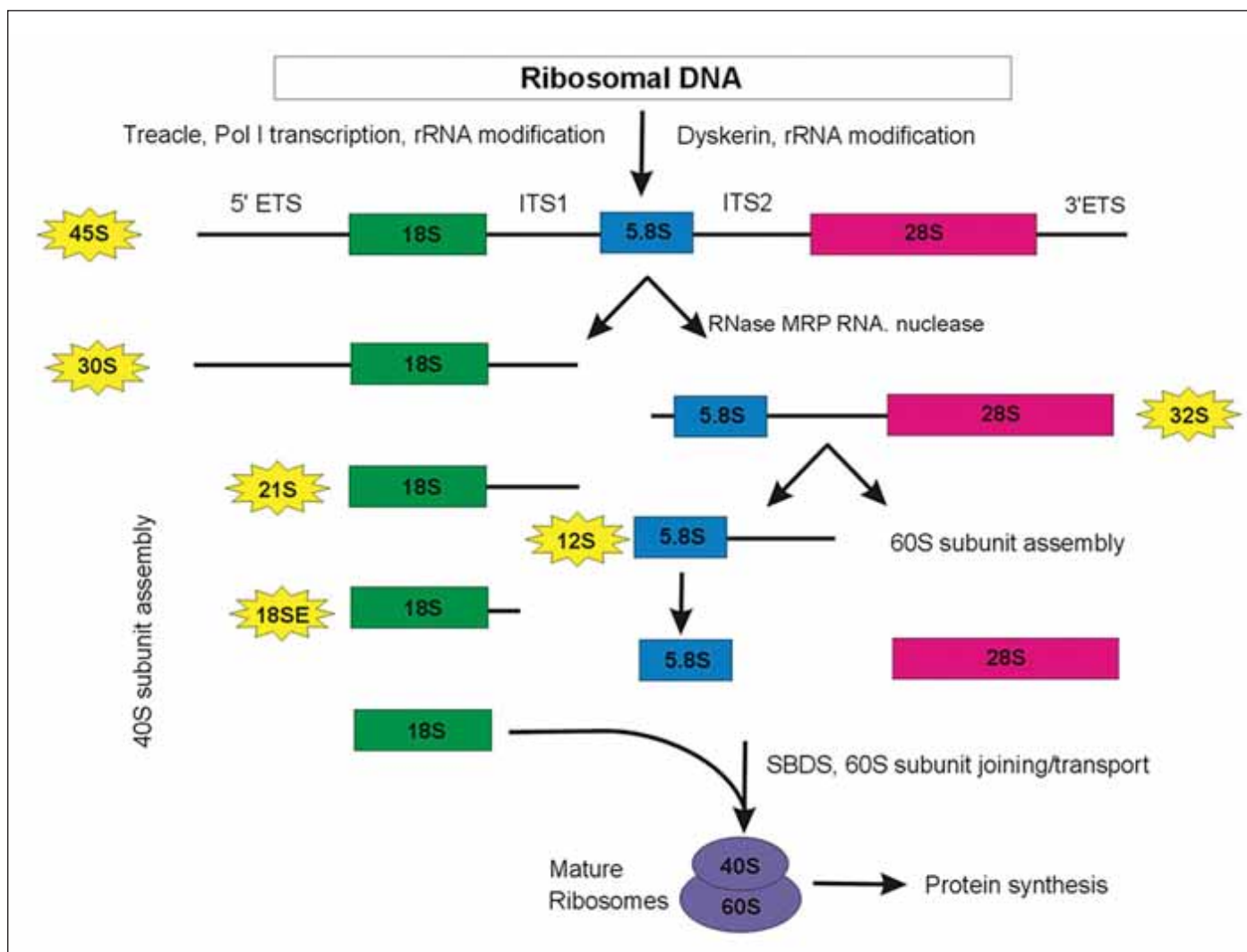


Schéma 1.

RPS19, součásti malé ribozomální podjednotky u švédského pacienta. Mutace genu kódujícího RPS19 byly postupně prokázány u 25 % pacientů s DBA. RPS19 je komponentou malé 40S ribozomální podjednotky a je lokalizován v nukleolu, hlavním buněčném místě transkripce při biogenezi ribozomů. Role některých RP není dosud u vyšších eukaryot přesně známa. Delece jedné alely RP vede k poruše růstu a snížené tvorbě 40S ribozomální podjednotky, což vede k tzv. „ribozomálnímu stresu“. Buňka reaguje aktivací p53 proteinu a indukci apoptózy. Dalším důsledkem je snížení rychlosti translace, a tím i proteosyntézy, což může ovlivnit procesy s velkým nárokem na přísun proteinů – tedy s rychlým obrátem produkce buněk, jako je hematopoéza, obnova kožních buněk a buněk GIT.

V dalších letech byly u pacientů s DBA postupně nalezeny mutace genů kódujících dalších 20 ribozomálních proteinů (RP): RPS7, RPS10, RPS15A, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS27, RPS28, RPS29; RPL5, RPL9, RPL11, RPL15, RPL18, RPL26, RPL27, RPL31, RPL35, and RPL35A. V rámci dalšího výzkumu byly postupně označeny mutace dvou dalších genů, které nekódují RP: GATA1, důležitého transkripčního faktoru pro erythropoézu, a TSR2, který kóduje protein ovlivňující apoptózu a maturaci ribozomů. DBA tedy vzniká v důsledku haploinsuficience ribozomálních proteinů. Aktivace p53 proteinu i snížení translace bylo prokázáno na buněčných (naše citace) i zvířecích modelech DBA. Jsou dále intenzivně studovány extraribozomální funkce RP a jejich možná úloha při

vzniku somatických anomálií. V České republice vznikl jeden z prvních světových registrů Diamond-Blackfanovy anémie.

### Shwachman-Diamondův syndrom

Shwachmanův-Diamondův syndrom (SDS) je vzácné autozomálně recesivně dědičné onemocnění charakterizované selháním kostní dřeně s vysokým rizikem transformace do MDS, AML a vzácně do ALL, mnohočetnými vývojovými abnormalitami (metafyzální chondrodysplazie, dysplazie žebér, osteopenie, malý vzrůst), a exokrinní pankreatickou insuficiencí. Prevalence onemocnění je udávána 1 / 77 000 živě narozených) (Myers et al., 2014). Toto onemocnění poprvé identifikovali Shwachmann, Bodian a Diamond v roce 1964. V roce 2003 bylo prokázáno, že bialeická mutace genu

Shwachman-Bodian-Diamond Syndrom (SBDS) je molekulární příčinou SBDS. Uvádí se, že protein kódovaný tímto genem je kofaktorem GTPázy 1 podobné elongačnímu faktoru (EFL1). V posledním kroku zrání cytoplazmatického ribozomu odstraňuje anti-asociační faktor (EFL1) eIF6 z velké ribozomální podjednotky, což umožňuje vstup podjednotky 60S do aktivně překládaného stavu a nakonec spojení s malou ribozomální podjednotkou a tvorbu aktivního ribozomu. Protože mutace v genu kódujícího SBDS může narušit seskupování ribozomálních podjednotek, je SDS možno klasifikovat jako ribozomopatii. V poslední době se uvádí, že mutace v jiných genech spojených se SBDS způsobují onemocnění podobná SDS. Zejména se jedná o geny DNAJC21, EFL1 a SRP54, které jsou všechny zapojeny společně s SBDS při odstraňování eIF6 z velké podjednotky ribozomu.

Mutace v SBDS a příbuzných genech tedy způsobují snížení schopnosti sestavování ribozomů v buňce, což podobně jako u DBA může ovlivnit globální translaci, ale také snížit tkáňově specifické translace vybraných mRNA přispívající potom k rozvoji různých projevů onemocnění. Významný může být i dopad na tkáň s vysokou proliferativní aktivitou, například v průběhu embryonálního vývoje. Navíc narušení zrání ribozomů může vyvolat aktivaci dráhy ribozomálního stresu a stabilizaci p53, což má různé důsledky specifické pro jednotlivé tkáně. Například ztráta genu SBDS v myši slinivce vyvolává aktivaci p53 a ztrátu trávicích enzymů, což vede k atrofii postnatálních acinárních buněk v důsledku indukce stárnutí buněk. Na SDS buněčných liniích byla rovněž prokázána abnormální exprese mnoha genů kooperujících při biogenezi ribozomů a rRNA a mRNA procesování a dále snížená exprese řady genů kódujících ribozomální proteiny, které jsou důležité v procesu buněčného růstu a přežití (*RPS9*, *RPS20*, *RPL6*, *RPL15*, *RPL22*, *RPL23*, a *RPL29*). SBDS navíc kosedimentuje s 60S ribozomální prekurzorovou pod-

jednotkou v sukrozových gradientech a asociuje s 28S rRNA, která je komponentou 60S podjednotky.

### Treacher-Collinsův syndrom.

Seznam nově popsaných ribozomopatií rychle narůstal a mezi ribozomopatie byly zařazeny i syndrom hypoplazie vlasů a chrupavek (CHH) s doprovodnou hypoplazií kostní dřene a Treacherův-Collinsův syndrom (TCS). Od nejranější klasifikace byla tato onemocnění považována za typické příklady vrozených ribozomopatií. Jejich počet dále narůstal a postupně byla definována skupina méně detailně charakterizovaných dědičných poruch struktury a funkce ribozomů.

Postupně bylo prokázáno, že narušením biogeneze ribozomu je spuštěn nukleolární stres se stabilizací p53 a následnou apoptózou. Proto, jak bylo prokázáno, snížená proliferace a apoptóza NCC může být způsobena nukleolárním stresem zlepšením symptomů u embryí *Tcof1 +/-* myši po léčbě inhibitorem p53.

V posledních letech došlo ke zvýšení počtu onemocnění identifikovaných jako **nové vrozené ribozomopatie**. Jejich počet bude pravděpodobně narůstat. Tato extrémně vzácná onemocnění jsou charakterizována mutacemi ribozomálních proteinů nebo ve faktorech podílejících se na biogenezi ribozomu, ale k úplnému pochopení jsou nutné další studie. Jedná se o heterogenní onemocnění vykazující generalizované multisystémové příznaky nebo alternativně specifitější projevy selektivní pro jednu tkáň nebo orgán. Příkladem multisystémového onemocnění je Bowen-Conradi syndrom, vzácná autozomálně recesivní porucha, kterou poprvé popsali Bowen a Conradi v populaci hutteritů, která se vyznačuje mentální retardací, mikrocefalií, mikrognaíí, prominujícím nosem a kontrakturami kloubů. Toto závažné onemocnění je příčinou předčasné smrti u dětí; ve skutečnosti je průměrný věk úmrtí 13 měsíců. Nedávno bylo prokázáno, že příčinou Bowen-Conradiho syndromu je mutace genu *EMG1* kódující

ribozomální protein, čímž je toto onemocnění zahrnuto do seznamu ribozomopatií. Mutace v *EMG1* způsobuje zpoždění zpracování 18SrRNA s výsledkem snížené rychlosti buněčné proliferace se zástavou v G2 / M.

### ZÍSKANÉ RIBOZOMOPATIE

V roce 2010 bylo poprvé popsáno onemocnění, za jehož fenotypem se skrývala získaná porucha funkce ribozomů, nikoliv germinální mutace RP: MDS 5q-. Jeho klinické, morfologické a i některé laboratorní charakteristiky se velmi podobají změnám u pacientů s mutacemi *RPL5* a *RPL11* u Diamondovy-Blackfanovy anémie.

Tato porucha, která se častěji vyskytuje u žen starších 75 let, je způsobena somatickou delecí krátkého ramene chromozomu 5, vedoucí k makrocytární anémii a erytroidní hypoplazii, která u některých pacientů může následně progredovat do AML. Haploinsuficience genu, kódujícího *RPS14*, byla identifikována pomocí screeningu založeného na interferenci RNA, jako převládající příčina myelodysplastického fenotypu u 5q- syndromu, což naznačuje, že kořenem získaných poruch může být také změna v procesu biogeneze ribozomu. Od *RPS14* nebyly hlášeny žádné další extra-ribozomální funkce, syndrom 5q- lze považovat za čistě získanou ribozomopatii. Jeho některé laboratorní charakteristiky se velmi podobají změnám u pacientů s mutacemi *RPL5*, 11 u Diamondovy-Blackfanovy anémie. V následujících letech byly mutace ribozomálních proteinů odhaleny u některých maligních hematologických onemocnění. Pochopení molekulárního mechanismu, který je základem většiny z těchto poruch, je zásadní a může být významně přispět k detailnímu výzkumu základních mechanismů produkce ribozomu v lidské buňce.

### MUTACE RP A MALIGNÍ ONEMOCNĚNÍ

Již dlouho je známo, že proces biogeneze ribozomu je u maligních one-

mocnění vysoce deregulovaný [x], což naznačuje, že některé podskupiny lidských nádorů lze také považovat za získané ribozomopatie. Jako nejčastější mutace u akutní myeloidní leukémie byly popsány mutace genu NPM1 kódujícího multifunkční ribozomový faktor pro zpracování nukleofosminu. Mutace genů kódujících ribozomální proteiny byly poprvé popsány u dětské akutní lymfoblastické leukémie, kde byly rekurentní mutace genů RPL10 a RPL5 nalezeny přibližně u 10 % všech případů. Velmi zajímavé je, že rozsáhlá studie na více než 10 000 genomech z lidských nádorů různého původu ukázala, že hemizygotní delece genů kódujících ribozomální proteiny se vyskytují ve více než 40 % případů. Kromě toho je k dispozici rostoucí množství údajů o mutacích snRNA a změnách exprese u lidských vícečetných typů rakoviny. Všechny tyto studie naznačují, že **deregulace ribozomu a jeho biogeneze je častým rysem maligních onemocnění**. V mnoha případech lze samotné maligní onemocnění alespoň do určité míry považovat za získanou ribozomopatii. Přesná role většiny těchto alterací biogeneze ribozomu však ještě zbývá určit.

Omezenější a specifitější účinek je účinek způsobený mutacemi v ribozomálním proteinu malé podjednotky, RPS20. Mutace v RPS20 byla spojena s podtypem dědičného kolorektálního karcinomu (CRC) nazývaná familiární kolorektální karcinom typu X (FCCTX), u které bylo nalezeno několik patogenních variant predisponujících genů. V rodině postižené CRC a u pacienta byly hlášeny dvě různé heterozygotní mutace RPS20 s dědičným CRC. Ukázal to experiment provedený na vzorcích z rodiny postižené CRC. Haploinsuficience RPS20 způsobila sníženou biogenezi ribozomu a následnou stabilizaci p53, který je pravděpodobně zodpovědný za výběr buněk, které unikají regulaci p53. Protože u dvou výše zmíněných příkladů v současnosti neexistují žádné další extra-ribozomální funkce z produktů příslušných genů, lze onemocnění považovat za čistou ribozomopatii. K potvrzení této hypotézy je nutný další výzkum. Další příklad tkáňově specifického účinku mutací v ribozomálním proteinu jsou mutace v RPL10. Ve skutečnosti bylo hlášeno, že missense mutace se změnou v proteinové sekvenci může vést ke vzácné formě autismu nebo mikrocefalie. Vadný vývoj nervového systému může být způ-

soben reakcí. U RPL10 však byly hlášeny také extra-ribozomální funkce. Ribozomální protein L10 v mitochondriích slouží jako regulátor hladiny ROS v buňkách rakoviny pankreatu; proto dokud není vyhotovena podrobnější charakterizace molekulární patogeneze této poruchy, může být považována za domnělou smíšenou ribozomopatii.

### Literatura

- Gripp KW, Curry C, Olney AH et al. Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dysostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *Am J Med Genet A*. 2014;164 A(9):2240–2249
- Da Costa L, Leblanc T, Mohandas N. Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2020; 136(11):1262–1273
- Volejnikova J, Vojta P, Pospisilova D. Czech and Slovak Diamond-Blackfan Anemia (DBA) Registry update: Clinical data and novel causative genetic lesions. *BloodCells Mol Dis*. 2020;81:102380.
- Boria I, Garelli E, Pospisilova D. The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *HumMutat*. 2010;31(12):1269–1279.
- Kapralova K, Jahoda O, Pospisilova D et al. Oxidative DNA Damage, Inflammatory Signature, and Altered Erythrocytes Properties in Diamond-Blackfan Anemia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9652.
- Bezzeri V, Cipolli M. Shwachman-Diamond Syndrome: Molecular Mechanisms and Current Perspectives. *Mol Diagn Ther* 2019;23(2):281–290.

## Mechanismus mutagenese onkogenů u CML rezistentní k léčbě inhibitory tyrozinových kináz

Čuřík N.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Fúzní gen *BCR-ABL1* představuje klíčový molekulární marker a zároveň řídicí onkogen pro rozvoj chronické myeloidní leukémie (CML). Tento gen kóduje chimerickou tyrozinovou kinázu s deregulovanou aktivitou, která vede k maligní transformaci na úrovni hematopoetické kmenové buňky a k nadměrné proliferaci buněk myeloidní krevní řady. Na-

sazení cílené terapie inhibitory tyrozinových kináz (TKI) inhibujících aktivitu *BCR-ABL1* vedlo k revolučnímu zlepšení výsledků léčby CML a prodloužení doby přežívání pacientů s tímto onemocněním. To se týká především pacientů v chronické fázi onemocnění s relativně indolentním průběhem (v našich podmínkách 95 % všech pacientů s CML),

zatímco progresse do pokročilých fází, akcelerované fáze, a především blastického zvratu, jakkoliv k ní dochází vzácně (< 5 %), se stále vyznačuje kriticky špatnou prognózou [1].

Prvním z TKI využitým v klinické praxi CML byl imatinib (TKI 1. generace), který dodnes zůstává a pravděpodobně v nejbližší budoucnosti i zůstane nejčas-

těži předepisovaným lékem první linie léčby CML [2]. Asi 10–15 % pacientů s CML nicméně vykazuje nebo vyvíjí vůči imatinibu rezistenci [1]. Mezi významné molekulární mechanismy zodpovědné za tuto rezistenci patří somatické mutace, a to jednak mutace v kinázové doméně (KD) BCR-ABL1, ale také mutace v některých dalších genech.

### ROLE SOMATICKÝCH MUTACÍ V REZISTENCI CML

Mutace KD BCR-ABL1, jsou zodpovědné asi za 30 % případů získané rezistence na imatinib v první linii u pacientů v chronické fázi CML, zatímco jejich výskyt v pokročilých fázích onemocnění je výrazně častější [1]. Snaha cíleně překonat rezistenci spojenou s mutacemi v KD BCR-ABL1 vedla k postupnému zavedení TKI 2. (nilotinib, dasatinib, bosutinib) a 3. (ponatinib) generace. Zatímco zaměření translačního výzkumu na mutace v kinázové doméně BCR-ABL1 vedlo k dalšímu významnému zlepšení výsledků léčby pacientů s CML, role somatických mutací v jiných genech byla u CML po dlouhou dobu do značné míry opomíjena. Pouze relativně nedávno byla na základě zhodnocení řady dílčích studií stanovena poměrně úzká skupina rekurentně mutovaných genů (např. *ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *BCORL1*), které bývají nezářídka mutovány i v dalších hematologických malignitách, a určeny různé vzorce dynamiky rozvoje mutací u CML v souvislosti s léčbou TKI [3,4]. Pokud jde o konkrétní biologický a klinický význam mutací v jednotlivých genech u CML, stále zůstává řada nevyřešených otázek. Pacienti s CML nesoucí v genech mutace pro epigenetické regulátory však již v době diagnózy vykazují horší léčebnou odpověď než pacienti bez těchto mutací. Zvýšená zátěž somatických mutací byla asociována s rezistencí na imatinib v první linii [3,4]. Obecně lze předpokládat, že relaps onemocnění bývá často asociován právě s rekurentními mutacemi v různých onkogenních a tumor supresorových genech.

### OBECNÉ HYPOTÉZY ROZVOJE MUTACÍ V CML

Přes zásadní klinický význam rezistence na léčbu TKI u CML způsobené mutacemi v KD BCR-ABL1 a/nebo dalších genech, není samotný proces vedoucí k získání onkogenních mutací dosud plně charakterizován. V zásadě existují dvě hypotézy vysvětlující rozvoj těchto mutací. Na základě detekce mutací v KD BCR-ABL1 u nově diagnostikovaných pacientů s CML v pokročilých fázích onemocnění byl navržen model, kdy během léčby TKI dochází k pozitivní selekci a expanzi již dříve existující subpopulace leukemických buněk nesoucích mutaci udělující buňkám rezistentní fenotyp [5]. V posledních letech bylo publikováno několik studií, které oproti tomu předpokládají akvizici mutací v KD BCR-ABL1 *de novo* během působení imatinibu na leukemické buňky se zapojením epigenetických mechanismů a aberrantně regulovaných opravných drah poškození DNA [6,7].

Naše studie navázala na předchozí výzkum na tomto poli s hypotézou, že 1) rozvoj somatických mutací v KD BCR-ABL1 i dalších genech nepředstavuje pouhý pasivní proces selekce a expanze již existujících mutovaných klonů, ale je založen především na získání mutací *de novo* během léčby a 2) že zahrnuje deregulaci nebo je způsoben deregulací signálních drah a molekulárních mechanismů, kterými buňka reaguje na poškození DNA a řídí jejich opravy.

K testování první části naší hypotézy byl využit *in vitro* model klonů buněčné linie KCL-22 (myeloblasty CML). Pomocí průtokové cytometrie bylo sortováním z jedné buňky do média s nízkou hladinou imatinibu získáno 33 rostoucích klonů, kterým byla následně postupně zvyšována koncentrace imatinibu v médiu až na 4  $\mu$ M. Vedle toho byly sortováním z jedné buňky do média bez imatinibu připraveny i senzitivní klony, představující srovnávací kontroly. Celkově se podařilo připravit 6 klonů KCL-22 rezistentních na 4  $\mu$ M imatinib, z nichž u 4 byla provedena de-

tailnější analýze. Při ní byla v určitých časových bodech až do dne 205 po sortování prováděna detekce přítomnosti somatických mutací. Přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 byla sledována na úrovni transkriptu pomocí sekvenování nové generace (NGS), s následným ověřením alelově specifickou kapkovou digitální PCR (ASO-ddPCR) na úrovni námi charakterizované genomické fúze BCR-ABL1 linie KCL-22. Zároveň byly přímo na úrovni DNA stanovovány pomocí NGS panelu mutace dalších 32 genů a vybraných exonů genů často mutovaných u myeloidních malignit (s následným ověřením přítomnosti vybraných mutací pomocí ASO-ddPCR). Analýza ukázala, že žádný ze 33 původně získaných klonů sortovaných do média s nízkou hladinou imatinibu neměl v době po sortování mutace v KD BCR-ABL1. Mutace v KD BCR-ABL1 rovněž nebyly detekovány v žádném z kontrolních klonů. Mutační analýzy naopak ukázaly, že mutace zodpovědné za rezistenci k imatinibu u 4 analyzovaných klonů rostoucích při 4  $\mu$ M koncentraci byly prvně detekovány až 60–75 dní od sortu (na hladině 0,4  $\mu$ M imatinibu). Ve 3/4 klonů šlo o jednotlivé mutace v KD BCR-ABL1 (T315I, Y253H a E255K), v 1/4 klonů pak šlo o mutaci v genu KRAS (G12D) bez přítomnosti mutace v KD BCR-ABL1. Tyto výsledky naznačují, že mutace v KD BCR-ABL1 a KRAS nesoucí rezistenci k imatinibu ve 4 námi vyvinutých a podrobně analyzovaných klonech byly získány *de novo*. Aby byl tento závěr podpořen, byly použity uchované buňky těchto klonů z doby krátce po sortu (kdy v nich nebyly detekovány mutace v KD BCR-ABL1 nebo KRAS) do experimentu opětovného vývoje rezistence na 4  $\mu$ M imatinib, který byl na buňkách pocházejících z každého klonu proveden v biologických triplikátech. Nově získané rezistentní klony pak v tomto případě skutečně nesly jiné spektrum mutací a v některých případech se naopak nepodařilo klon rezistentní na 4  $\mu$ M imatinib získat. Tato data výrazně podporují hypotézu o přítomnosti procesu de-

novo mutagenese vedoucí k získání rezistentního fenotypu.

## ROLE DEREGULACE DRAH BUNĚČNÉ ODPOVĚDI NA POŠKOZENÍ DNA A JEJICH OPRAV V ZÍSKÁVÁNÍ MUTACÍ U CML

Tak jako v případě obecných mechanismů rozvoje mutací u CML nepanuje shoda ani v otázce navržených molekulárních mechanismů, které jsou za akvizici mutací zodpovědné. Rozvoj mutací je podle některých studií asociován s expresí, nikoliv nutně s aktivitou BCR-ABL1, a mutační frekvence endogenního lokusu BCR-ABL1 byla stanovena jako signifikantně vyšší než mutační frekvence transdukovávané BCR-ABL1 cDNA, což naznačuje možné zapojení epigenetického profilu samotného BCR-ABL1 lokusu do procesu mutagenese [6]. Následně byla popsána role NAD<sup>+</sup>-dependentní deacetylázy SIRT1, která aktivuje proces opravné dráhy tzv. kanonického (klasického) nehomologního spojování konců DNA (cNHEJ); využívá proteiny XRCC4, XRCC5/Ku80, XRCC6/Ku70 a DNA ligázu IV), konkrétně se váže a následně deacetyluje protein XRCC6, a jejíž inhibice deplecí intracelulárního NAD<sup>+</sup> zabránila akvizici mutací v KD BCR-ABL1 po vystavení leukemických buněk imatinibu [7].

Naopak jiné výzkumné skupiny popsaly v rezistentních leukemických buňkách sníženou expresi výše zmíněných genů zapojených do cNHEJ oprav dvouřetězcových zlomů DNA a zvýšenou expresi genů zapojených do „záložního“ procesu alternativního nehomologního spojování konců (altNHEJ); využívá proteiny PARP1, DNA ligázu I a DNA ligázu III), náchylného k chybám. AltNHEJ by mohl být aktivován přímo proteinem BCR-ABL1, který dereguluje činnost signalizačních drah zvyšujících množství reaktivních forem kyslíku (ROS) v leukemických buňkách a v důsledku toho zvyšuje jejich genomickou nestabilitu [8] a/nebo transkripční aktivitou onkoproteinu MYC [9].

V naší studii byl při hledání těchto deregulovaných drah využit přístup vycházející z analýzy exprese 128 jednotlivých genů účastnicích se drah reakce leukemické buňky na poškození DNA a oprav těchto poškození v době první detekce mutací v časových bodech 60–75 dní po sortu u 4 analyzovaných rezistentních klonů. Genová exprese v rezistentních kloněch byla srovnána s expresí u 4 kontrolních klonů rovněž v dni 60 po sortu, s cílem identifikovat především geny se statisticky průkaznou, výrazně odlišnou expresí v obou studovaných souborech klonů KCL-22 (Rozdíl exprese mezi rezistentními a kontrolními klony byl minimálně 2,5násobný;  $p < 0,05$ ). Takových genů bylo identifikováno 11, z nichž u 1 byla exprese v rezistencích kloněch snižena a u 10 zvýšená. Analýzou pomocí vybraných databází buněčných drah a klastrovou analýzou bylo zjištěno, že jako nejvíce relevantně zapojené dráhy aktivované v době mutagenese se jevila mismatch oprava a oprava vystřížením báze (BER). Následně byla proto porovnána exprese genů asociovaných s mismatch opravou v rezistentních/mutovaných i kontrolních/nemutovaných kloněch, kdy byla zjištěna zvýšená exprese genů s obecnější funkcí v opravách poškozené DNA (např. *PCNA*, *POLD3* a *DNA ligáza I*), zatímco exprese genů, jejichž produkty se podílejí na přímém rozpoznání nespárované DNA (*MSH6*, *MLH3*, *MSH3*, *PMS2*) se mezi oběma skupinami prakticky nelišila. Proto bylo přistoupeno k porovnání exprese genů účastnicích se obou variant BER – krátké varianty, při které dochází k odstranění a náhradě jednoho nukleotidu, i dlouhé varianty, při které dochází v místě opravy k odstranění a následné nové syntéze 2–10 nukleotidů [10]. Zatímco exprese genů účastnicích se krátké varianty BER se mezi rezistentními a citlivými klony nelišila, vykazovaly geny účastnicích se dlouhé varianty BER signifikantně zvýšenou expresi. Protože se některé z těchto genů, konkrétně DNA ligáza I a UNG, rovněž účastní již výše zmíněné chybné altNHEJ dráhy oprav

dvouřetězcových zlomů DNA, byla změřena i exprese DNA ligáz a jejich funkčních partnerů, kdy byla v rezistentních kloněch stanovena v době mutagenese vedle zvýšené exprese DNA ligázy I také zvýšená exprese genu *PARP1*, který se rovněž účastní altNHEJ dráhy. Pomocí chromatinové imunoprecipitace bylo zjištěno, že regulační úseky genů *DNA Ligázy I* a *PARP1* byly v době mutagenese epigeneticky aktivované a na regulačním úseku *Ligázy I* byla prokázána vazba transkripčního faktoru MYC.

Následně bylo studováno, zda výsledky získané na *in vitro* buněčném modelu klonů KCL-22 budou relevantní také v primárních buňkách pacientů s CML. Exprese DNA ligáz a jejich funkčních partnerů byla nejprve stanovena v CD34<sup>+</sup> kmenových a progenitorových buňkách pacientů s CML v různých klinicky definovaných stádiích nemoci (diagnóza, neoptimální odpověď na léčbu imatinibem, optimální odpověď na léčbu imatinibem). Bylo zjištěno, že exprese Ligázy I a PARP1 představujících altNHEJ dráhu je v porovnání s expresí genů zapojených do klasické NHEJ dráhy relativně vysoká v době diagnózy a v době rezistence CML, a naopak relativně nízká v době optimální odpovědi pacientů na léčbu imatinibem, kdy v hematopoéze převažují neleukemické CD34<sup>+</sup> buňky. Exprese genů účastnicích se dlouhé varianty BER dráhy a také exprese DNA ligáz byla rovněž stanovena v celkových leukocytech z periferní krve pacientů s CML v době diagnózy a v době první detekce somatických mutací a porovnána s expresí v leukocytech z periferní krve zdravých dárců. Výsledky ukázaly, že v době diagnózy CML a zejména v době předpokládané mutagenese je zvýšena exprese stejných genů účastnicích se dlouhé varianty BER a altNHEJ dráhy, jaká byla pozorována i na modelu rezistentních klonů KCL-22.

## SHRNUTÍ

Včasný záchyt mutací v KD BCR-ABL1 je dnes součástí standardní péče o pacienty s CML a díky několika genera-



cím TKI v našem léčebném arzenálu můžeme ve většině případů provést optimální terapeutickou volbu vedoucí k jejich eradikaci. Na druhou stranu resistance spojená se somatickými mutacemi v dalších genech i v kombinaci s mutacemi v KD BCR-ABL1 může v řadě případů stále představovat terapeutický problém. Samotný proces vedoucí k rozvoji onkogenních mutací v CML a molekulární mechanismy, které jsou za získávání mutací zodpovědné, nejsou dosud plně charakterizovány. Navrženy byly modely expanze již existující mutované subpopulace přítomné před zahájením léčby i model získávání mutací *de novo* během léčby TKI. Zároveň byly navrženy různé mechanismy akvizice mutací zahrnující epigenetické procesy, působení ROS a deregulaci drah opravujících poškození DNA. Naše práce přinesla data, která jsou v souladu s modelem, kde somatické mutace asociované s refrakterní CML jsou získávány *de novo*, a naznačila, že mechanismy získávání mutací v KD BCR-ABL1 a v dalších genech mohou být identické. Právě *de novo* mutace získané v průběhu léčby TKI zaujímají velkou část

lézí spojených s rezistencí na TKI [4]. Tato data podporují již dříve představené výsledky o roli chybné altNHEJ dráhy v rezistenci CML a rovněž ukazují na aktivaci dlouhé varianty opravné dráhy vstřížení báze. Několik identifikovaných aberantně exprimovaných genů se podílí na činnosti více opravných drah, jejichž činnost proto může být v CML komplexně deregulovaná. Naše data by mohla poskytnout pojitko mezi obecnou genomickou nestabilitou leukemických buněk CML [8] a akvizicí bodových mutací udělujících buňkám rezistentní fenotyp.

### Literatura

1. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966–984.
2. Shih YT, Cortes JE, Kantarjian HM. Treatment value of second-generation BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors compared with imatinib to achieve treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukaemia: a modelling study. *Lancet Haematol*. 2019;6(8):e398–e408.
3. Branford S, Kim DDH, Apperley JF, et al. Laying the foundation for genomically-based risk assessment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33(8):1835–1850.

4. Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2017;129(1):38–47.
5. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;2(2):117–125.
6. Yuan H, Wang Z, Gao C, et al. BCR-ABL gene expression is required for its mutations in a novel KCL-22 cell culture model for acquired resistance of chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem*. 2010;285(7):5085–5096.
7. Wang Z, Liu Z, Wu X, et al. ATRA-induced cellular differentiation and CD38 expression inhibits acquisition of BCR-ABL mutations for CML acquired resistance. *PLoS Genet*. 2014;10(6):e1004414
8. Sallmyr A, Tomkinson AE, Rassool FV. Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks. *Blood*. 2008;112(4):1413–1423.
9. Muvarak N, Kelley S, Robert C, et al. c-MYC Generates Repair Errors via Increased Transcription of Alternative-NHEJ Factors, LIG3 and PARP1, in Tyrosine Kinase-Activated Leukemias. *Mol Cancer Res*. 2015;13(4):699–712.
10. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(6):981–993. doi: 10.1007/s0018-009-8736-z.

## Terapie genovou editací u hematologických onemocnění

Škvárová Kramaržová K.

CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

Geneticky podmíněné choroby jsou závažná onemocnění, která postihují miliony pacientů po celém světě. Pro mnohé z nich v současné době neexistuje kauzální léčba a jejich terapie je zaměřena pouze na potlačení symptomů. Monogenně podmíněná onemocnění postihující hematopoézu či imunitní systém představují velkou část těchto chorob. Jedná se o velmi heterogenní skupinu, mezi jejíž nejznámější zástupce patří srpkovitá anémie, talasémie či hemofilie, dále vrozené syndromy selhání kostní dřeně a primární imuno-

deficiencie. Jedinou definitivní léčbou pro většinu těchto pacientů je alogenní transplantace krvetvorných buněk (TKD), při které jsou hematopoetické kmenové buňky pacienta (HSPCs), nesoúcího ve svém genomu kauzální genetickou lézi, nahrazeny buňkami zdravého dárce. Nedostatek HLA-shodných dárců a rizika spojená s alogenní TKD, zejména dlouhodobé komplikace v podobě reakce štěpu proti hostiteli, představují významné podněty pro vývoj vhodnějších a bezpečnějších léčebných přístupů.

Přímé zacílení genetické podstaty onemocnění je bezpochyby nejatraktivnější vyvíjenou strategií pro terapii monogenně podmíněných onemocnění. Jejím cílem je nahrazení či oprava poškozeného kauzálního genu v buňkách pacientů. Již první pokusy o vložení funkčních kopií genů do DNA patientských buněk pomocí virových vektorů prokázaly svou účinnost. Výsledkem desítek let výzkumu je v současné době již několik přípravků na bázi této tzv. genové terapie schválených pro léčbu pacientů s nejrůznějšími genetickými chorobami

včetně těch, které postihují hematopoézu a imunitní systém (beta talasémie, ADA-SCID). V těchto případech je terapeutického efektu docíleno vložením „zdravé“ kopie genu do genomu pacientových HSPCs, které jsou následně vráceny zpět do jeho těla. Díky integraci genu do DNA HSPCs je zajištěno, že veškeré spektrum dceřiných hematopoetických buněk, které z takto modifikovaných HSPCs vznikne, bude mít ve svém genomu vložený funkční gen. Zkušenosti s odběrem a manipulací s HPSCs dělají z hematologických onemocnění v současné době nejatraktivnější cíl pro aplikaci léčebných přístupů založených na genové terapii. Mnoho dalších preklinických a klinických studií navíc ukázalo slibné výsledky i u ostatních monogenně podmíněných chorob.

I přes tyto úspěchy je genová terapie stále spojena s řadou limitací (např. absence terapeutického významu u aktivačních mutací) a také rizik (genotoxicita a imunotoxicita). Lákavou alternativou této strategie, která eliminuje mnohé její nedostatky, je přesná oprava poškozeného genu v DNA pacientových buněk pomocí speciálních molekulárních nástrojů v procesu zvaném genová editace. Samotný princip genové editace vychází z fyziologického procesu opravy poškození DNA (tzv. dvouřetězcového zlomu DNA), který se běžně odehrává v buňkách. Během něj dochází k opravě zlomu DNA buď pomocí rychlého, ale velmi nepřesného procesu – tzv. nehomologního spojování konců DNA (NHEJ), nebo přesnou výměnou poškozeného úseku za „zdravou“ DNA sesterské chromatidy či homologního chromozomu v rámci tzv. homologní rekombinace (HDR). Obě tyto dráhy lze využít pro dosažení cílené změny DNA v buňkách a to tak, že pomocí speciálních molekulárních nástrojů vytvoříme dvouřetězcový zlom DNA v konkrétním místě genomu. Během následné opravy tohoto zlomu lze buňku „donutit“, aby do opravené DNA genu inkorporovala požadované změny. Je-li takto např. vytvořen dvouřetězcový zlom na začátku

kódující oblasti genu, mohou nepřesnosti vznikající během následné opravy tohoto místa pomocí NHEJ vést k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného stop kodónu. Výsledkem takové opravy je tzv. „knock-out“ (KO) neboli vypnutí genu. Pokud je však do buňky vložen navíc i syntetický úsek DNA (tzv. templát), jehož sekvence je podobná editované oblasti, je zlom opraven výměnou templátové sekvence za genomickou DNA pomocí HDR. Jakákoliv odlišnost v pořadí nukleotidů templátové DNA je tak vnesena do editované oblasti genu.

Speciální molekulární nástroje, které nám umožňují vytvořit dvouřetězcový zlom DNA v požadovaném místě genomu, se nazývají místně-specifické nukleázy. Nejznámějšími zástupci těchto nástrojů jsou nukleázy tzv. systému CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Protein 9*) [1]. Nukleázy CRISPR/Cas9 jsou na své místo určeny v DNA naváděny pomocí krátké molekuly RNA (tzv. guide RNA). Právě díky možnosti jednoduše změnit zacílení nukleázy pouhou změnou sekvence gRNA (bez nutnosti složitého proteínového inženýrství), si CRISPR/Cas9 získal svou oblibu a široké uplatnění napříč takřka všemi biotechnologickými obory a velmi slibné výsledky začíná ukazovat i v translační medicíně. Zde se uplatňují strategie využívající jak umlčení genů pomocí NHEJ, tak i přesnou opravu genových mutací pomocí HDR, a některé z nich se již dostaly do fáze klinického testování [2].

Jedním z nejhezčích příkladů terapeutického umlčování genů je studie zaměřená na pacienty s beta talasémií závislou na transfúzích (TDT) či srpkovitou anémií (SCD), jejichž genetickou příčinou jsou mutace v beta globinovém genu mající za následek absenci/defekt molekuly hemoglobinu (ClinicalTrials.gov NCT03655678 (TDT) a NCT03745287 (SCD)). V rámci této strategie jsou pacientovi odebrány HSPCs, ve kterých je následně po-

mocí CRISPR/Cas9 nukleázy umlčen erytroidně-specifický aktivátor genu BCL11A. Tento gen je zodpovědný za utlumení exprese fetálního gamma globinového řetězce již krátce po narození. Jsou-li pacientovy HSPCs s umlčenou oblastí genu BCL11A vráceny zpět do kostní dřeně, dávají vznik erytrocytům, u nichž byla obnovena exprese gamma globinu. Ten je poté schopen nahradit funkci mutovaného beta globinového genu, a vytvořit tak funkční molekulu hemoglobinu. Začátkem roku 2021 byly publikovány případy prvních dvou pacientek léčených touto strategií, které ukázaly velmi slibné výsledky [3]. Jak pacientka s SCD, tak i pacientka s TDT vykazovaly již v řádu několika týdnů po aplikaci autologních CD34+ krvinek s umlčeným genem BCL11A dramatický nárůst produkce erytrocytů exprimujících fetální hemoglobin a tato hodnota se ustálila na > 90 % všech erytrocytů po celou dobu sledování pacientek (> 1 rok). Souběžně s obnovením produkce fetálního hemoglobinu vymizela potřeba aplikace krevních transfuzí a také výskyt vazookluzivních krizí u pacientky s SCD. Na tyto povzbudivé výsledky navazuje další klinická studie pro pacienty s SCD (NCT04774536), v rámci které bude v CD34+ buňkách pacientů provedena tentokrát přesná oprava kauzální mutace v beta globinovém genu pomocí genové editace systémem CRISPR/Cas9. Vzhledem k obecně nižší účinnosti přesných změn v DNA ve srovnání se strategií umlčování genů bude jistě velmi zajímavé, zda se i této studii podaří prokázat klinický benefit editovaných erytrocytů.

V rámci preklinických studií je v současné době testován potenciál genové editace v léčbě mnoha dalších monogenně podmíněných hematologických chorob, jako jsou např. Fanconio anémie, ribozomopatie, hemofilie či těžké kombinované imunodeficiencie. Genová editace však nachází uplatnění i v léčbě jiných než geneticky podmíněných onemocnění. V současné době již probíhá

několik klinických studií, které využívají genovou editaci k vylepšení funkcí tzv. CART-buněk či tumor-specifických T-lymfocytů v léčbě nádorových onemocnění včetně akutních leukémií. Jedná se např. o umlčení genů kódujících inhibiční receptory (PD-1, CTLA-4), díky čemuž lze zabránit imunitnímu vyčerpání těchto klíčových cytotoxických buněk. Jedním z největších potenciálních benefitů genové editace v této oblasti je však možnost přípravy tzv. univerzálních CAR-T buněk, které umožní aplikaci CAR-T terapie i u pacientů, u nichž nelze modifikovat jejich vlastní T-lymfocyty.

Genová editace systémem CRISPR/Cas9 je považována za nejvýznamnější po-

krok v biomedicině od objevu polymerázové řetězové reakce. Přestože neuběhlo ani 10 let od objevu této technologie, díky své jednoduchosti, účinnosti a širokému spektru využití již nyní potvrzuje svůj přínos v nejrůznějších oblastech včetně personalizované genomické medicíny. Povzbudivé výsledky z preklinických a klinických studií jistě musí být potvrzeny na širších souborech dlouhodobě sledovaných pacientů. Unikátní charakter takto koncipovaných terapeutických strategií, které cílí na příčinu choroby a nejen na její symptomy, nám nicméně dává naději, že již brzy bude možné pomoci genové editací úspěšně léčit pacienty se závažnými genetickými chorobami včetně onemocnění

postihujících hematopoézu a imunitní systém.

### Grantová podpora

Podpořeno PRIMUS/19/MED/004.

### Literatura

1. Jinek M, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. American Association for the Advancement of Science. 2012;337(6096):816–821. doi: 10.1126/science.1225829.
2. Ferrari S, et al. Gene Editing of Hematopoietic Stem Cells: Hopes and Hurdles Toward Clinical Translation. *Frontiers in Genome Editing*. Frontiers Media SA 2021;3:618378. doi: 10.3389/fgeed.2021.618378.
3. Frangoul H et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society 2021;384(3):252–260. doi: 10.1056/nejmoa2031054.

## Lymfomy a imunitní systém

Lysák D.

Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň

Funkcí imunitního systému je chránit organismus před patogeny, jako jsou viry a bakterie, ale také rozpoznávat a eliminovat poškozené a maligně transformované buňky. Imunitní systém je tvořen dvěma hlavními komponentami – vrozenou a adaptivní imunitou.

Vrozená imunita je první linií obrany, která reaguje na patogeny a stresové signály ze tkání, a její součástí je řada buněk, jako jsou NK buňky, neutrofil, makrofágy. NK buňky mají významnou protinádorovou aktivitu zejména u tumorů s nízkou expresí MHC I. třídy, které jsou pro ně inhibičním signálem, či silnou produkcí ligandů aktivačních receptorů NK buněk (MIC-A, MIC-B, ULB atd.). Aktivitu NK buněk zvyšují cytokiny jako IL-2, IL-15, IFN- $\gamma$  a další a dají se aktivovat také prostřednictvím Fc receptoru, který reaguje na protilátkou opsonizované cílové buňky.

Adaptivní imunita je zprostředkovaná T- a B-lymfocyty a umožňuje cílenější reakci specifickou pro daný antigen a zároveň je možné ji dlouhodobě uchovat pomocí paměťových buněk. T-lymfocyty rozpoznávají prostřednictvím T-buněčného receptoru (TCR) peptidy derivované z nádorových antigenů nabízené antigen prezentujícími buňkami (APC), které je vystavují na svém povrchu. Každá jaderná buňka může nabízet endogenní antigeny (nádorové, virové) prostřednictvím MHC I. třídy (MHC I) cytotoxickým CD8+ T-lymfocytům, profesionální APC nabízejí exogenní antigeny pomocným CD4+ T-lymfocytům přes MHC II. třídy (MHC II), ale také cytotoxickým lymfocytům přes MHC I v rámci zkřížené prezentace. V případě lymfomů je tento proces komplikován tím, že nádorové antigeny jsou vlastní (často endogenní) proteiny, a jsou tedy jen slabě imunogenní. Nádory s větším množ-

stvím mutací zpravidla nabízejí více antigenních cílů. Nejde ale jen o prosté množství mutací, ale také o přítomnost specifických klonálních antigenů (například z variabilních regionů Ig), které zvyšují pravděpodobnost T-buněčné odpovědi [1]. Předpokladem protinádorové imunitní odpovědi tedy je dostatečná imunogenicita nádoru a rozpoznání nádorového antigenu imunitním systémem (T-lymfocyty).

Zjednodušeně lze rozdělit interakci mezi nádorem a imunitním systémem do několika fází. Nejprve dochází k uvolnění nádorového antigenu, který je zpracován antigen prezentujícími buňkami. Následuje prezentace antigenů T-lymfocytům a jejich aktivace, po které mohou cytotoxické T-lymfocyty (CTL) atakovat nádorové buňky uvnitř nádorového mikroprostředí a ničit je cytotoxickou reakcí [2]. Aktivace T-lymfocytů je silně regulovaný proces, který umožňuje eliminovat infikované či nádorové buňky, ale zároveň předcházet nežádoucímu poškození tkání či vzniku autoimunity. Schopnost imunitního systému reagovat na hrozbu je tedy doprovázena schopností regulovat míru vlastní aktivity, aby ji bylo po potlačení hrozby možné utlumit. Tato rovnováha je zajištěna komplexní interakcí s antigen prezentujícími a regulačními buňkami, které poskytují aktivační a supresivní signály modulující imunitní odpověď [3]. Vazba antigenu na T-buněčný receptor sama o sobě není pro aktivaci T-lymfocytu dostatečná a jsou potřeba další aktivační/kostimulační signály. Sekundární signál je nejčastěji zprostředkovaný přes B7-CD28 interakci mezi molekulami CD80/CD86 na APC a CD28 na T-lymfocytech. Působení obou signálů umožní nejen aktivaci, ale také expanzi a persistenci T-lymfocytů, naopak pokud

je přítomen pouze první signál, tedy rozpoznání antigenu, bez další kostimulace (sekundární signál), T-lymfocyt přechází do anergie a následně apoptózy. Imunitní odpověď je dále modulována pozitivními a negativními kostimulačními signály. T-lymfocyt může být ovlivňován prostřednictvím aktivačních receptorů jako CD137 (4-1BB), CD134 (OX-40), CD27. Současně ale dostává negativní signály inhibičních receptorů reagujících na ligandy přítomné na nádorových a antigen prezentujících buňkách (*immune checkpoint receptors* – ICR), jako jsou interakce PD1/CD279 (*programmed cell death 1*) či CTLA-4/CD152 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). PD1 na CTL reaguje na PD-L1/L2, zatímco CTLA-4 je alternativním receptorem kostimulačních B7 molekul (CD80/86) a kompetuje o vazbu s CD28. CTLA-4 je exprimován také na regulačních T-lymfocytech (Tregs) a ovlivňuje T-buněčnou aktivaci také zevní cestou interakcí s APC.

Účinná proti-lymfomová imunitní odpověď však vyžaduje více než jen aktivaci T-lymfocytů. Nádorově specifické T-lymfocyty musí proliferovat, aby byly přítomné v dostatečném množství potřebném pro ovlivnění lymfomu, a musí také dlouhodobě přetrvávat, aby byly schopné dlouhodobě kontrolovat nádorové elementy, případně se musí vyvinout paměťové buňky schopné re-expanze při reaktivaci lymfomových buněk. T-lymfocyty u lymfomů jsou navíc výrazně ovlivňovány nádorovým mikroprostředím, které do značné míry situaci ztěžuje.

Nádorové mikroprostředí (TME) v lymfatických uzlinách a dalších tkáních infiltrovaných lymfomem je tvořeno imunitními buňkami a dalšími komponentami, jako jsou dendritické buňky, chemo-

kiny/cytokiny, exosomy, extracelulární matrix atd. Složení nádorového mikroprostředí u lymfomů se jeví jako ideální pro vznik efektivní protinádorové odpovědi, protože imunitní buňky jsou zde v přímém kontaktu s nádorovým klonem. Přesto není nádor imunitním systémem dostatečně kontrolován, může růst a umožnit tak klinickou progresi. TME usnadňuje lymfomovým buňkám únik imunitnímu systému a hraje důležitou roli v podpoře nádorového růstu. Tradičně jsou Th2 lymfocyty považovány za elementy podporující růst nádoru prostřednictvím IL-4, CD40-CD40L interakce. Naopak Th1 buňky posilují protinádorovou imunitu díky sekreci IL-2, IL-12 a IFN- $\gamma$  a následné inflamaci vedoucí k aktivaci CTL, APC a NK buněk [4]. Toto rozdělení rolí není ale tak jednoznačné a záleží pravděpodobně na schopnosti nádoru ovlivňovat biologickou funkci Th1 i Th2 buněk. Podpůrnou funkci mají i mesenchymální stromální buňky napomáhající adhezii a homingu nádorových lymfocytů a také tumor asociované makrofágy (TAM) produkující IL-15.

Nádory mají extrémně komplexní mechanismy, které jim umožňují uniknout imunitnímu dohledu. Lze je rozdělit na vnitřní, dané nádorovou buňkou, a zevní, zprostředkované jinými buňkami. Lymfomové buňky se snaží stát neviditelnými pro imunitní systém a zároveň se aktivně bránit imunitní eradikaci. Mezi hlavní mechanismy zodpovědné za nedostatečnou imunitní odpověď u lymfomů patří:

- snížení či ztráta exprese MHC antigenů na maligních lymfocytech;
- zvýšená exprese imunosupresivních ligandů na nádorových lymfocytech;
- přítomnost supresivních buněčných populací v mikroprostředí nádoru;
- sekrece supresivních cytokinů.

Nádorové buňky mohou omezovat produkci nádorových antigenů, čímž se stávají hůře rozpoznatelnými pro T-lymfocyty a unikají imunitní odpovědi. Protinádorová imunita představuje selektivní

tlak, který umožňuje přežívání a růst variantních nádorových buněk se sníženou imunogenicitou. Genetická nestabilita nádorových buněk je spojená s mutacemi genů kódujících nádorové antigeny a buňky bez jejich exprese získávají díky imuno-editování nádoru růstovou výhodu. Více imunogenní klony jsou postupně eliminovány a dochází k expanzi nádorové populace s defektní expresí nádorového antigenu.

Nicméně na úniku lymfomu z imunitního dohledu se vedle omezení exprese nádorových antigenů podílí zejména downregulace nebo ztráta exprese MHC molekul I. a II. třídy, která znemožní prezentaci antigenu (snížení syntézy MHC molekul,  $\beta$ 2M atd.). Pacienti s Hodgkinovým lymfomem mohou mít sníženou expresi MHC I. třídy až v 75 % případů a tento pokles se projevuje kratším PFS [5]. Aberaci MHC exprese lze pozorovat i u jiných lymfomů (DLBCL, PCNSL) a zpravidla znamená omezenou imunitní odpověď a horší léčebné výsledky [4,6]. Vliv MHC II může být dále ovlivněn LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*) signalizací, kdy se tento inhibiční ko-receptor váže na MHC II a dále omezuje jeho funkci [7].

Lymfom je schopen také aktivně tlumit imunitní odpověď. Dochází k upregulaci imunosupresivních ligandů na lymfomových buňkách. Zvýšená exprese PD-L1/PD-L2, tedy ligandů inhibičního receptoru PD-1 na T-lymfocytech, chrání nádorové lymfocyty před aktivací efektorových T-buněk, které inhibuje a vede k jejich vyčerpání a apoptóze. Upregulace PD-L1 se netýká jen samotných nádorových buněk, ale také například makrofágů a dalších buněk v mikroprostředí nádoru. Zvýšená exprese PD-L1 u DLBCL je podle některých studií spojena s horší prognózou onemocnění [1]. Vyšší hladiny ICR jsou patrné také u virově asociovaných lymfomů (EBV, HHV8) v důsledku upregulace PD-1 na CD8+ lymfocytech při chronické virové infekci. Na potlačení T-lymfocytů se ale podílejí i další inhibiční receptory jako např. TIM-3 (T-cell immunoglobulin mucin 3) či LAG-3.

Imunitní odpověď je oslabována také přítomností regulačních T-lymfocytů nebo tumor asociovaných makrofágů. Tregs působí řadou mechanismů včetně exprese CTLA-4 a sekrece IL-10, který inhibuje funkci CTL. Monocyty a makrofágy podporují růst nádorových buněk, exprimují často PD-L1/L2. Lymfomové buňky se mohou samy fagocytóze bránit zvýšenou expresí CD47 („*don't-eat-me*“ signál), jehož vazba na SIRP $\alpha$  (*signal regulatory protein alpha*) na povrchu TAM potlačuje fagocytózu. Vyšší hladiny CD47 mRNA byly pozorovány u chemo-refrakterních DLBCL (8). Výrazný inhibiční vliv mají také myeloidní derivované supresorové buňky (MDSC) oslabující jak vrozenou (dendritické buňky), tak adaptivní imunitní odpověď (inhibice aktivity a proliferace T-lymfocytů) [9].

Růst lymfomu je usnadněn komplexním milieu cytokinů a dalších solubilních faktorů. Nádorové lymfocyty nebo další buňky v TME mohou exprimovat nebo vylučovat imunosupresivní proteiny/cytokiny, které aktivitu T-lymfocytů inhibují. Dysfunkce T-lymfocytů způsobuje například TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), který zároveň podporuje diferenciaci Tregs. Maligní B-lymfocyty produkují IL-10, který je negativním regulátorem T-buněčné odpovědi, snižuje expresi MHC II molekul i kostimulačních molekul (CD80/86), podporuje činnost MDSC a Tregs. IL-12 sice zpočátku zvyšuje funkci T-lymfocytů, ale dlouhodobá expozice vede k jejich vyčerpání [10].

Míra infiltrace nádorového mikroprostředí T-lymfocyty umožňuje rozdělit lymfomy na skupinu „se zánětem“ (*inflamed*) a „bez zánětu“ (*noninflamed*). Lymfomy se zánětem jsou senzitivnější k léčbě check-point inhibitory v porovnání s lymfomy bez zánětu, u kterých je méně infiltrujících imunitních buněk. Hodgkinův lymfom je prototypem lymfomu se zánětem, kde infiltrující imunitní buňky převažují nad nádorovými RS buňkami, které produkují řadu prozánětlivých cytokinů. Na druhou stranu řada jiných lymfomů, jako například DLBCL, má nezánětlivé mikroprostředí,

a to buď v důsledku jejich rychlého růstu, který neumožní infiltraci CTL (přestavba MYC, BCL2/BCL6 poskytuje výraznou autonomní proliferaci nezávislou na mikroprostředí), nebo díky molekulárnímu profilu, který oslabuje imunitní odpověď. Folikulární lymfom jako níže maligní lymfom roste sice pomalu, ale je schopen přeprogramovat své mikroprostředí (aktivací B-buněčného receptoru, sekrecí IL-4 atd.), které pak podporuje nádorový růst a ignoruje imunitní dohled [4].

Imunitní systém tedy hraje důležitou roli v potlačení nádoru, na druhou stranu abnormální zánětlivá reakce může ve skutečnosti podporovat rozvoj malignity. Během normální zánětlivé odpovědi se imunitní buňky snaží zničit patogenní podnět. Avšak v rámci komplexního mikroprostředí nádorů může být tato aktivita přeprogramována nádorovými buňkami a místo eliminace transformovaných buněk jsou imunokompetentní buňky schopné podporovat růst a migraci nádoru.

Výše uvedené mechanismy způsobují dysfunkci imunitního systému, což vede k suboptimální imunitní odpovědi a umožňuje persistenci a následnou progresi lymfomu. Na druhou stranu nádorové imunopresivní mechanismy poskytují prostor k modulaci a reaktivaci imunitní odpovědi. Existují různé imunoterapeutické přístupy, které jsou efektivní v léčbě lymfomů, resp. obecně hematologických nádorů, jejichž cílem je omezit schopnost nádoru odolávat imunitní odpovědi, zvýšit jeho imunogenicitu a maximalizovat imunitní odpověď hostitele. Snahy o posílení protinádorové imunity mohou směřovat do různých fází interakce nádor – imunitní systém. Můžeme se snažit usnadnit prezentaci antigenu, zvýšit množství nádorových antigenů a stresových signálů, zlepšit rozpoznání nádorových buněk T-lymfocyty, přímo aktivovat T- nebo NK buňky nebo blokovat supresivní checkpoint signály. Protože T-lymfocyty jsou jedním z hlavních zprostředkovatelů protinádorové imunitní odpovědi, smě-

řuje řada postupů právě na tuto buněčnou populaci.

Prakticky můžeme protinádorovou imunoterapii rozdělit na aktivní, kdy se snažíme zvýšit kvalitu imunitní odpovědi, a pasivní, kdy se aplikují nádorově specifické protilátky nebo lymfocyty. Mezi aktivní přístupy patří zejména imunizace protinádorovými vakcínami obsahujícími nádorové antigeny, a to nejčastěji ve formě vakcín na bázi dendritických buněk nebo DNA vakcín, jejichž cílem je usnadnit prezentaci nádorových antigenů imunitnímu systému, a navodit tak silnou T-buněčnou odpověď. Podobnou strategií je blokáda CD47 antigenu na lymfomových buňkách, což způsobuje zvýšení aktivity makrofágů. Výraznější funkce makrofágů pak umožní efektivnější prezentaci nádorových antigenů a kombinace tohoto přístupu s aplikací rituximabu nabízí slibné výsledky [12].

Aktivace suprimovaných nebo anergních T-lymfocytů pomocí protilátek cílených na kostimulační molekuly, jako CD27, CD40, prokázala omezenou klinickou účinnost, která je vysvětlována přítomností supresivních signálů (např. PD-1). Pouhá aktivace intra-tumorových lymfocytů není dostatečná na pozadí inhibičních signálů z nádorového mikroprostředí.

Velmi slibnou metodou je blokáda inhibičních drah pomocí tzv. immune check-point inhibitorů (ICI). Blokáda ICR je schopna obnovit aktivaci T-lymfocytů a zvýšit protinádorovou odpověď u B- i T-lymfomů. K dispozici je protilátka proti CTLA-4 (ipilimumab) s pouze omezenou aktivitou u NHL a protilátka proti PD-1 (nivolumab, pembrolizumab), které jsou efektivní u řady R/R lymfomů exprimujících PD-L1/L2 (díky zvýšení počtu kopií 9p24.1 se zvýšenou amplifikací PD-L1/L2 genů nebo EBV indukovanou upregulací). Zejména u Hodgkina lymfomu dosahují obě blokační protilátky výborných odpovědí u onemocnění refrakterních na chemoterapii, imunoterapii i autologní transplantaci. Bohužel u většiny nehodgkinovských

lymfomů není samostatná PD-1 blokáda dostatečná a nabízí se kombinace s další terapií zaměřenou na nádorové buňky, jako jsou monoklonální protilátky (rituximab, brentuximab vedotin), chemoterapie nebo cílené inhibitory (ibrutinib) [11].

Do oblasti pasivní imunoterapie patří zejména adoptivní přenos in vitro manipulovaných imunokompetentních buněk s protinádorovou reaktivitou. Může se jednat o aktivované NK buňky, tumor infiltrující lymfocyty (TIL), nicméně největší úspěch zaznamenaly v léčbě lymfomů, ale i jiných malignit T-lymfocyty s chimerickým antigenním receptorem (CAR-T). Geneticky modifikované lymfocyty pacienta jsou vybavené arteficiálním receptorem, který se váže na cílový antigen podobně jako monoklonální protilátka a spouští aktivaci T-lymfocytu. Nádorová buňka je eliminována cytotoxickou aktivitou, aktivací apoptotických drah a také díky produkci prozánětlivých cytokinů, které zapojují další komponenty imunitního systému. Výhodou CAR T-lymfocytů je fakt, že ke své funkci nepotřebují obvyklou signalizaci T-buněčného receptoru, a nejsou tedy závislé ani na expresi MHC molekul nádorem. Součástí receptoru jsou navíc kostimulační domény, které poskytují sekundární signál nutný pro aktivaci a expanzi modifikovaných lymfocytů. Samozřejmě i CAR T-lymfocyty mohou být brzděny supresivními signály jako běžné T-lymfocyty, a proto se ověřují různé strategie, jak je proti těmto vlivům ochránit. CD19 specifické CAR-T se ukázaly být efektivní u relabující či refrakterní akutní lymfoblastické leukémie z B-buněk a velkobuněčných nehodgkinovských lymfomů a jejich využití expanduje do léčby dalších hematologických i solidních nádorů.

Velmi efektivním způsobem aktivace T-lymfocytů nebo NK buněk je využití bispecifických (nebo polyspecifických) protilátek či molekul s bi(poly)specifickou vazbou. Tyto protilátky váží nádorový receptor např. na B-lymfocytech (CD19, CD22, CD30) a zároveň stimulační

receptor T- nebo NK buněk (CD3 resp. CD16). Díky tomu se nádorová a efektorová buňka dostávají do těsné blízkosti, což vede k přímé aktivaci efektorové buňky proti nádoru. Protilátky označované jako BiTE (*bi-specific T-cell engager*) nebo BiKE (*bispecific killer cell engager*) mohou vyvolat potentní imunitní odpověď dokonce u výrazně refrakterních onemocnění.

Lymfomy představují specifický typ nádorů, které v nádorovém mikroprostředí soustředí maligní elementy spolu se všemi důležitými součástmi imunitního systému. Bohužel se v tomto imunitně teoreticky ideálním prostředí uplatňuje řada okolností, které imunitní odpověď blokuje. Svoji roli hraje downregulace MHC molekul a naopak zvýšená exprese imunopresivních ligandů na lymfomových buňkách, kterým asistuje přítomnost supresivních imunitních subpopulací a cytokinů. Jedná se navíc o prostředí velmi variabilní, s různou buněčnou kompozicí, genovou a proteinovou expresí, aktivitou cytokinů a ligandů. Imunoterapie nabízí metody k omezení útlumu imunitního systému a k jeho reaktivaci, které zvyšují

jeho protinádorovou efektivitu. Nutná bude pravděpodobně výrazná individualizace léčby, která nabídne imunoterapii nebo její kombinaci optimální pro daného pacienta, a to s ohledem na konkrétní typ jeho nádoru a stav jeho imunitního systému. Zároveň lepší porozumění imunobiologii lymfomů umožní v budoucnu lépe překonávat imunitní dysfunkce a dosahovat dlouhodobé kontroly lymfoidních neoplazií při akceptovatelné toxicitě léčby.

### Grantová podpora

Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPI, 00669806), grantem MZ 15-30661A a grantem Nadace pro transplantaci kostní dřeně.

### Literatura

1. Falchi L. Immune Dysfunction in Non-Hodgkin Lymphoma: avenues for new immunotherapy-based strategies. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017;12:484–494.
2. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity Review.* 2013;39:P1–P10.
3. Ansell SM. Fundamentals of immunology for understanding immunotherapy for lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2020;1:585–589.
4. Csizmar CM, Ansell SM. Engaging the innate and adaptive antitumor immune re-

sponse in lymphoma. *Int J Mol Sci* 2021;22:3302.

5. Roemer MG, Advani RH, Redd RA, et al. Classical Hodgkin lymphoma with reduced  $\beta$ 2M/MHC class I expression is associated with inferior outcome independent of 9p24.1 status. *Cancer Immunol Res.* 2016;4:910–916.

6. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood.* 2004;103:4251–4258.

7. Joshi M, Ansell SM. Activating the antitumor immune response in non-Hodgkin lymphoma using immune checkpoint inhibitors. *Journal of Immunology Research.* 2020;8820377.

8. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell.* 2010;142:699–713.

9. Azzaoui I, Uhel F, Rossille D, et al. T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood.* 2016;128:1081–1092.

10. Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest.* 2012;122:1271–1282.

11. Tun AM, Ansell SM. Immunotherapy in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: Innate, adaptive and targeted immunological strategies. *Cancer Treatment Reviews.* 2020;88:102042.

## CAR T-cell terapie

Folber F.

*Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno*

### ÚVOD

Současná medicína nepřináší více frustrující momenty, než když nedokážeme vyléčit pacienta s onemocněním, které je potenciálně kurabilní. Jednou z takových situací jsou opakovaně relabující nebo refrakterní non-hodgkinské B lymfomy (B-NHL). Naději zde přináší buněčná terapie pomocí autologních T lymfocytů s chimerickým antigenním receptorem (CAR-T), která může dosahovat obdobných výsledků jako transplan-

tace krvetvorných buněk, její podání nevyžaduje remisi onemocnění a nepřináší s sebou zásadní krátkodobou ani závažnou dlouhodobou toxicitu [1].

Začátkem procesu výroby CAR-T lymfocytů jsou autologní T lymfocyty odebrané pomocí leukaferézy. Tento buněčný produkt se odesílá v chlazené nebo zmražené podobě výrobcí. Ve výrobním závodě je provedena selekce T lymfocytů a do nich je pomocí virového vektoru vložen gen pro chimerický

antigenní receptor (CAR), určující cíl, proti kterému jsou tyto imunokompetentní buňky zaměřeny. Jeho struktura obsahuje také kostimulační a aktivační doménu, případně i další součásti. Dále jsou tyto buňky kultivovány, pročištěny a procházejí kontrolou kvality. Takto vyrobené CAR-T lymfocyty jsou zamrazeny a vzniká výsledný léčivý přípravek moderní terapie (LPMT), který je poté odeslán zpět do certifikovaného centra. Vlastnímu podání předchází několika-

denní lymfodepleční přípravná chemoterapie, která obvykle obsahuje kombinaci fludarabinu a cyklofosfamidu (FluCy). Přípravek CAR-T je rozmrazen přímo u lůžka pacienta a podán intravenózně cestou centrální žilní kanyly.

Nejčastější nežádoucí reakce zahrnují pokles parametrů krevního obrazu (neutropenie, trombocytopenie) jednak v důsledku podané chemoterapie, jednak imunitním působením buněk. Po podání dochází k aktivaci podaných CAR-T lymfocytů, jejich přihojení a množení (expansi). Výsledná žádoucí aktivace imunitního systému může být ale i přehnaná, projevující se jako syndrom z uvolnění cytokinů (CRS). Při této komplikaci se vždy objevují febrilie, může ale také docházet k hypotenzi nebo hypoxii. Léčba spočívá v tlumení horečky antipyretiky, podpoře oběhu katecholaminů v případě hypotenze a podávání kyslíku brýlemi nebo maskou a v nejtěžších případech i umělé plicní ventilaci. Efektivní řešení CRS zahrnuje také podávání kortikoidů (dexametazonu) a tocilizumabu (monoklonální protilátka proti receptoru pro interleukin 6), a to nejlépe v časných stadiích jeho rozvoje. Druhým specifickým nežádoucím účinkem je syndrom neurotoxicity (ICANS). Projevuje se zpočátku mírnými poruchami koordinace jemných pohybů (např. psaní), poruchami paměti, vybarvování slov (expresivní afázie), orientace nebo počítání. Může vyústit i v závažnější formy s epileptickými křečemi, poruchou hrubé motoriky (paréza), otokem mozku nebo bezvědomím. Léčba je symptomatická a zahrnuje antiepileptika a kortikoidy (dexametazon nebo metylprednisolon) [2,3].

Dále popíšeme jednotlivé CAR-T preparáty pro léčbu lymfomů, které jsou již dostupné k použití nebo by měly být brzy registrovány, uvedeny jsou v abecedním pořadí.

### **AXIKABTAGEN CILOLEUCEL**

Axikabtagen ciloleucel (axi-cel, Yescarta) patří mezi CAR-T přípravky druhé generace. Extracelulární vazebná doména

je cílena proti antigenu CD19, přítomnému na povrchu B lymfocytů. Kostimulační a aktivační doménu tvoří části CD28 a CD3zeta fyziologického T lymfocytu. Registrovanou indikací je difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL) nebo primární mediastinální B lymfom (PMBCL), který je relabovaný nebo refrakterní po minimálně dvou liniích systémové léčby.

Bezpečnost a účinnost přípravku axi-cel byla vyhodnocena zejména v následujících publikacích:

Klinická studie ZUMA-1 [4]: Registrační multicentrická studie fáze 1/2, ve které bylo léčeno celkem 108 pacientů s DLBCL, PMBCL a DLBCL transformovaným z folikulárního lymfomu. Všem pacientům byl podán axi-cel po standardním přípravném režimu FluCy. Ve sledování s mediánem 27 měsíců byla dosažena celková léčebná odpověď (ORR) u 83 % a kompletní remise (CR) u 58 % nemocných. Medián trvání odpovědi byl 11 měsíců. Medián celkového přežití (OS) nebyl dosažen (u křivky přežití bylo pozorováno plateau těsně nad hranicí 50 %), medián přežití bez progresu (PFS) byl 5,9 měsíce. Nežádoucí účinky stupně 3 a horší byly pozorovány u 48 % hodnotitelných pacientů, 11 % tvořil CRS a 32 % neurotoxicita. Při prodlouženém sledování se nevyskytly žádné závažné pozdní nežádoucí účinky nebo nejasná úmrtí.

Zkušenosti z reálné klinické praxe v USA [5]: Do této retrospektivní multicentrické studie (17 center) bylo zařazeno celkem 275 pacientů léčených pomocí axi-cel. Během sledování s mediánem 12,9 měsíců byla ORR dosažena u 82 % a CR u 64 % nemocných. Závažné nežádoucí účinky stupně 3 a vyšší charakteru CRS se vyskytly u 7 % a neurotoxicita u 31 % pacientů. Nerelapsová mortalita činila 4 %. Medián PFS byl 8,3 měsíce, medián OS nebyl během sledování dosažen. Pacienti s horším výkonnostním stavem dle ECOG a vyšší hladinou laktátdehydrogenázy (LD) měli přežití zkrácené.

Dále byl nebo stále ještě je axi-cel hodnocen v klinických studiích ZUMA-5 (in-

dolentní B-NHL), ZUMA-6 (kombinace s atezolizumabem), ZUMA-7 (DLBCL ve 2. linii), ZUMA-9 (zvláštní přístup před registrací nebo při nesplnění všech kritérií kvality přípravku), ZUMA-11 (kombinace s utomilumabem), ZUMA-12 (DLBCL v 1. linii), ZUMA-14 (kombinace s rituximabem), ZUMA-19 (kombinace s lenzilumabem) a v reálné klinické praxi v USA, Francii, Německu a také v ČR. (Jednotlivé citace zde nejsou uvedeny z důvodu omezení jejich počtu v tomto sdělení.)

### **BREXUKABTAGEN AUTOLEUCEL**

Brexukabtagen autoleucel (brexu-cel, Tecartus) patří mezi CAR-T přípravky druhé generace. Extracelulární vazebná doména je cílena proti antigenu CD19. Kostimulační a aktivační doménu tvoří CD28 a CD3zeta. Výroba je téměř identická jako u axi-cel, liší se pouze odstraněním potenciálních odebraných nádorových buněk. Registrovanou indikací je lymfom z plášťových buněk (mantle cell lymfom, MCL) po dvou či více liniích systémové léčby, které zahrnovaly léčbu inhibitory Brutonovy tyrosinkinázy (BTK).

Bezpečnost a účinnost přípravku brexu-cel byla vyhodnocena zejména v následující publikaci:

Klinická studie ZUMA-2 [6]: Registrační multicentrická studie fáze 2, ve které bylo léčeno celkem 68 pacientů s MCL. Ve sledování s mediánem 12 měsíců byla dosažena ORR u 93 % a CR u 67 % nemocných. Mediány OS a PFS nebyly dosaženy, ve 12 měsících činilo OS 83 % a PFS 61 %. Nežádoucí účinky stupně 3 a horší byly pozorovány u 99 % hodnotitelných pacientů, 15 % tvořil CRS a 31 % neurotoxicita. Z fatálních událostí byly zaznamenány pouze 2 případy infekce.

### **LISOKABTAGEN MARALEUCEL**

Lisokabtagen maraleucel (liso-cel, Breyanzi) patří mezi CAR-T přípravky druhé generace. Extracelulární vazebná doména je cílena proti antigenu CD19.



Kostimulační a aktivační doménu tvoří 4-1BB a CD3zeta. Oproti ostatním přípravkům je zde zajištěno zastoupení CD4 a CD8 CAR-T lymfocytů v poměru 1 : 1. Registrovanou indikací v USA je velkobuněčný B lymfom (DLBCL, DLBCL transformovaný z indolentního B-NHL, high-grade B lymfom, PMBCL a folikulární lymfom grade 3b; vše s výjimkou primárního lymfomu CNS) po dvou či více liniích systémové léčby, registrace v EU je očekávána v průběhu roku 2021.

Bezpečnost a účinnost přípravku liso-cel byla vyhodnocena zejména v následující publikaci:

Klinická studie TRANSCEND NHL 001 [7]: Registrační multicentrická studie, ve které bylo léčeno celkem 269 pacientů s LBCL. Ve sledování s mediánem 19 měsíců byla dosažena ORR u 73 % a CR u 53 % nemocných. Medián trvání odpovědi nebyl dosažen, po 12 měsících trvala u 55 % nemocných. Medián OS činil 21 měsíců, medián PFS 6,8 měsíce. Ve 12 měsících bylo OS 58 % a PFS 44 %. Nežádoucí účinky stupně 3 a horší byly pozorovány u 79 % hodnotitelných pacientů, 2 % tvořil CRS a 10 % neurotoxicita. Optimální dávka byla stanovena na  $100 \times 10^6$  CAR-T lymfocytů.

Dále je liso-cel hodnocen v klinické studii TRANSFORM (agresivní B-NHL ve 2. linii).

## TISAGENLEKLEUCEL

Tisagenlecleucel (tisa-cel, Kymriah) patří mezi CAR-T přípravky druhé generace. Extracelulární vazebná doména je cílena proti antigenu CD19. Kostimulační a aktivační doménu tvoří 4-1BB a CD3zeta. Registrovanou indikací pro lymfomy je DLBCL po dvou nebo více liniích systémové terapie.

Bezpečnost a účinnost přípravku tisa-cel byla vyhodnocena zejména v následujících publikacích:

Klinická studie JULIET [8]: Registrační mezinárodní studie fáze 2, ve které bylo léčeno celkem 93 pacientů s DLBCL. Ve sledování s mediánem 14 měsíců byla dosažena ORR u 52 % a CR u 40 % nemocných. Ve 12 měsících činilo OS 49 % a PFS cca 33 %. Nežádoucí účinky stupně 3 a horší byly pozorovány u 89 % hodnotitelných pacientů, 22 % tvořil CRS a 12 % neurotoxicita.

Výsledky z reálné klinické praxe v USA [9]: V této retrospektivní multicentrické studii bylo hodnoceno celkem 155 pacientů s NHL léčených pomocí tisa-cel. Během sledování s mediánem 12 měsíců byla ORR dosažena u 62 % a CR u 40 % nemocných. V 6 měsících činilo OS 71 % a PFS 39 %. Závažné nežádoucí účinky stupně 3 a vyšší charakteru CRS se vyskytly u 12 % a neurotoxicita u 7,5 % pacientů.

Dále byl nebo ještě stále je tisa-cel hodnocen v klinických studiích BELINDA (agresivní B-NHL ve 2. linii) a ELARA (folikulární lymfom ve 2. a další linii) a v reálné klinické praxi ve Francii, Německu a také v ČR. Ve francouzské práci byly jako rizikové faktory pro časnou progresi vyhodnoceny zvýšená hladina LD, přítomnost více než jednoho extranodálního postižení a metabolicky aktivní nádor větší než 80 ml [10].

## ZÁVĚR

Terapie CAR-T lymfocytů nabízí naději na vyléčení pro pacienty s některými typy lymfomů v situacích, které jsou prognosticky jinak velmi nepříznivé. Spektrum dostupných preparátů a jejich indikací se postupně rozšiřuje. Zároveň narůstá nejen množství dat z klinických studií,

ale i zkušeností z reálné praxe. Jednou ze zásadních problematických otázek zůstává výběr vhodného pacienta pro tuto moderní, bezpečnou, avšak velmi nákladnou léčebnou metodu.

## Literatura

1. Hrabovský Š. CAR T-lymfocyty: horká novinka v léčbě nádorů. *Vnitřní lékařství* 2020;6(7):420–424.
2. Lee DW, Santomaso BD, Locke FL, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019;25:625–638.
3. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European society for blood and marrow transplantation (EBMT) and the Joint accreditation committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica* 2020;105(2):297–316.
4. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017;377:2531–2544.
5. Nastoupil LJ, Jain MD, Feng L, et al. Standard-of-care axicabtagene ciloleucel for relapsed or refractory large B-cell lymphoma: results from the US lymphoma CAR T consortium. *J Clin Oncol* 2020;38:3119–3128.
6. Wang M, Munoz J, Goy A, et al. KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2020;382:1331–1342.
7. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet* 2020;396(10254):839–852.
8. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2019;380(1):45–56.
9. Pasquini MC, Hu Z-H, Curran K, et al. Real-world evidence of tisagenlecleucel for pediatric acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Blood Adv* 2020;4(21):5414–5424.
10. Vercellino L, Di Blasi R, Kanoun S, et al. Predictive factors of early progression after CAR T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 2020;4(22):5607–5615.

## Bispecifické protilátky

Polgárová K., Trněný M.

1. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Imunoterapie je aktuálně nedílnou a rychle se rozvíjející součástí léčebných přístupů v hematologii. Krom monoklonálních protilátek, které přinesly revoluci v léčbě B-non-hodgkinských lymfomů (B-NHL), se dnes obrací pozornost i na přístupy rekrutující a/nebo aktivující imunokompetentní efektorové buňky s cílem destrukce buněk lymfomových. Tyto přístupy zahrnují některé monoklonální protilátky (obinutuzumab, tafasitamab), ale zejména checkpoint inhibitory, T-lymfocyty s chimérickými antigenními receptory (CAR T-lymfocyty) a bispecifické protilátky.

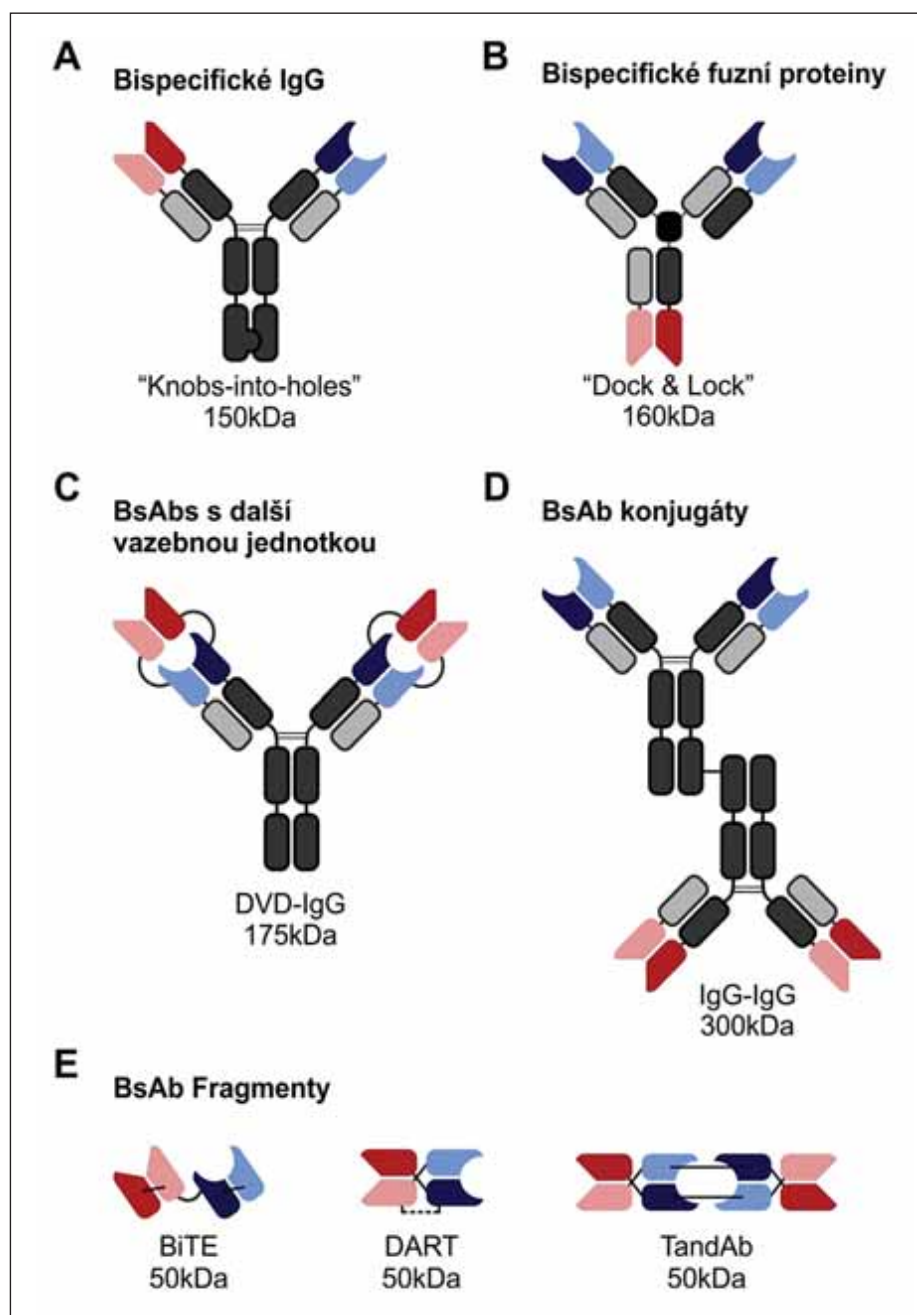
Bispecifické protilátky (bsAbs) jsou molekulární konstrukty založené na struktuře přirozených protilátek či jejich jednotlivých domén. Jsou specifické pro dva různé epitopy a podle počtu vazebných míst mohou být bivalentní, tri- nebo i tetravalentní. Díky vývoji v bioinženýrství je dnes popsáno více než 100 různých formátů, které lze podle struktury rozdělit do několika skupin (obr. 1):

- bsAbs se strukturou podobnou imunoglobulinu G (IgG), se specifickými podtypy, které překonávají problémy párování lehkých a těžkých řetězců;
- bsAbs s další vazebnou jednotkou;
- bispecifické fúzní proteiny s další funkcí nebo specificitou;
- konjugáty bispecifických protilátek;
- fragменты bispecifických protilátek vzniklé spojením variabilních jednořetězcových fragmentů (scFv).

Ačkoli se molekulární detaily těchto strukturálních skupin značně liší, z hlediska funkčnosti hrají důležitou roli především afinita vazebných domén k cílovému epitopu a přítomnost či nepřítomnost Fc fragmentu. BsAbs postrádající Fc oblast jsou obvykle založené na

scFv a obsahují variabilní oblasti těžkých a lehkých řetězců, které jsou navzájem spojeny různými přístupy (např. linkerem). Tyto molekuly jsou obvykle menší,

což může zlepšit penetraci do tkání, ale také vede ke kratšímu poločasů *in vivo*. To pak často vyžaduje kontinuální intravenózní podání. Bispecifické proti-



**Obr. 1. Alternativní formáty bispecifických protilátek (bsAb) v klinickém vývoji. Adaptace z Pytlík et al. [2].**

BiTE – bispecific T-cell engager, DART – dual affinity retargeting antibody, TandAb – tandem diabody

látky se začleněnou funkční Fc doménou mají delší poločas a díky aktivaci makrofágů a NK-buněk mohou vyvolat ADCC (od protilátek závislá buněčná cytotoxicita) a ADPC (od protilátek závislá fagocytóza) – tzv. trifunkční protilátky. Aktivní Fc doména však může bránit tvorbě cytolytické synapsi, vést k nežádoucí lýze rekrutovaných T-buněk, nebo zvýšit extranádorovou toxicitu. Některé novější konstrukty (např. glofitamab nebo mosunetuzumab) proto obsahují cílenou mutaci vazebných míst Fc oblasti, s výslednou limitací těchto nežádoucích účinků [1].

V kontextu protilymfomové terapie jsou bsAbs obvykle konstruované k přesměrování imunokompetentních buněk k buňkám nesoucím cílový (nádorový) antigen. V současné době se nejčastěji k tomuto přesměrování používá CD3 na povrchu T-lymfocytů, jakožto součásti T-buněčného receptoru. Vazba bsAb na T-buněčnou CD3 a současně na nádorový antigen exprimovaný na lymfomových buňkách umožňuje rekrutaci a aktivaci T-lymfocytů s následným vznikem cytolytické synapsy, uvolněním vezikul perforinu a granzymu B s výslednou destrukcí maligních buněk. Aby se zabránilo systémové aktivaci efektorových buněk bez přítomnosti cílových buněk, je afinita domény cílené na CD3 obvykle nižší ve srovnání s doménou cílenou na nádorový antigen [2]. Alternativně lze místo CD3 použít vazbu na CD5. Ukázalo se však, že tato je méně účinná při indukcii aktivace T-buněk ve srovnání se stimulací CD3; cílení dalšího pan T-lymfocytárního antigenu – CD2 nevedlo k dostatečné aktivaci T-buněk, kromě kostimulace se dvěma anti-CD2 protilátkami a tento koncept se v praxi neuplatnil [2].

## TOXICITA

Bispecifické protilátky mají široké spektrum nežádoucích účinků plynoucích z aktivace imunitního systému. Vedle toxicity spojené s destrukcí nenádorových buněk nesoucích cílový antigen (včetně normálních B-lymfocytů), či toxicity v důsledku protinádorového efektu (tumor

flare a syndrom nádorového rozpadu) zahrnují specifické nežádoucí účinky především syndrom uvolnění cytokinů (CRS) a neurotoxicitu (*immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome – ICANS*). Tyto se v souvislosti s aktivací efektorových buněk imunitního systému a produkcí prozánětlivých mediátorů vyskytují i u dalších terapeutických přístupů, které využívají přesměrování T-lymfocytů k nádorovým buňkám. Přesná patogenese není objasněna, nicméně u CRS se předpokládá mechanismus podobný jako u syndromu aktivovaných makrofágů i s obdobnými příznaky, vč. febrilií, známek aktivace endotelu s vazodilatací či syndromem děravých kapilár; laboratorně s vzestupem zánětlivých parametrů a hyperferitinémií. Za klíčové se považují cytokiny IL6, IL10 a  $INF\gamma$ , čehož se využívá i při terapii, která je v současné době založena na blokádě efektu IL6 za použití tocilizumabu, případně na tlumení zánětlivé odpovědi pomocí kortikoidů. CRS se typicky objevuje při první aplikaci, nejčastěji v prvních 48 hodinách, není však výjimkou i opakovaný výskyt v pozdějších cyklech. Většina protokolů pro použití BsAbs proto doporučuje i profylaktickou aplikaci kortikoidů (příp. i antihistaminik) [3].

V etiopatogenezi neurotoxicity se předpokládá porucha hematoencefalické bariéry vlivem aktivovaných T-lymfocytů a jejich extravazace s následným uvolněním cytokinů po vazbě na B-lymfocyty v CNS; aktivovaný endotel pak může atrahovat další buňky s následnou agravací ICANS v dalším vývoji. Často se vyskytuje společně s, nebo po CRS; popsány však byly i izolované projevy či projevy předcházející CRS. Za klíčový mediátor se považuje IL1. V terapii se vedle symptomatické léčby uplatňují především kortikoidy; tlumení dráhy IL1 je v současnosti předmětem studií [3].

## BISPECIFICKÉ PROTILÁTKY PRVNÍ GENERACE: BLINATUMOMAB

Blinatumomab, BiTE (*bispecific Tcell engager*) strukturálně založený na scFv

spojených linkerem, byl první bsAb schválenou pro léčbu pacientů s B-lymfoblastickou akutní leukémií. První studie u pacientů s refrakterním a/nebo relabovaným (R/R) B-NHL z počátku let 2000 (MT103-1 / 01-2001, MT103-1 / 01-2002, MT103 / 01-2003) ale neprokázaly významnou klinickou účinnost (pravděpodobně kvůli neefektivnímu dávkování). Odhalily však několik úskalí spojených s terapií založenou na BiTE. Krátký plazmatický poločas in vivo (2 hodiny), způsobený strukturou molekuly a její velikostí přibližně 55 kDa, vyžadoval kontinuální intravenózní infuzi k udržení cílové plazmatické hladiny. Vyšší dávky zase vedly k neočekávaným nežádoucím účinkům včetně neurotoxicity a CRS. Následné studie s blinatumomabem, ale i dalšími bsAbs, proto přijaly přístup postupné eskalace dávkování, aby bylo zajištěno dosažení cílové dávky s nižším rizikem komplikací. Pro B-NHL bylo hodnoceno několik dávkovacích protokolů s použitím kontinuálních infuzí po dobu 4 nebo 8 týdnů. V eskalační studii fáze I, která hodnotila antilymfomovou účinnost blinatumomabu u pacientů s R/R folikulárním lymfomem (FL), difúzním velkobuněčným lymfomem (DLBCL) a Mantle-cell lymfomem (MCL), byla maximální tolerovatelná dávka (MTD) stanovena na 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{den}$ . V kohortě pacientů léčených MTD (n = 35) byla celková odpověď (ORR) 69 %, u pacientů s DLBCL 55 %. Další studie fáze II ukázala, že efektivita u pacientů s R/R DLBCL je vysoce závislá na dosažení maximální dávky. V této eskalační studii (absolutní dávka 9-28-112  $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ) téměř třetina pacientů nedosáhla cílové dávky kvůli rychlé progresi onemocnění nebo kvůli toxicitě, zejména neurologickým nežádoucím účinkům. U hodnotitelných subjektů byla ORR 43 %, vč. 19 % kompletních remisí (CR). Podobných výsledků bylo dosaženo i v dalších studiích, s ORR a CR 37 % resp. 22 %, nicméně s nutností přerušení terapie u více jak poloviny pacientů kvůli progresi a/nebo toxicitě, především závažným projevům neurotoxicity (stupeň 3 a více), které se vyskytly u 30 % pacientů [4].

Aktuálně je v klinickém hodnocení kombinace blinatumomabu a dalších terapeutik, včetně check-point inhibitorů (NCT03340766) či lenalidomidu (NCT02568553). I přes jeho velký úspěch v terapii B-ALL se ale blinatumomab do širší klinické praxe v léčbě B-NHL nedostal, především v důsledku komplikovaných léčebných schémat s nejistým efektem a závažnými nežádoucími účinky. Představuje však „*proof of concept*“, který vedl k rozvoji dalších preparátů rekrutujících efektorové buňky imunitního systému k lymfomovým buňkám.

### BISPECIFICKÉ PROTILÁTKY DRUHÉ GENERACE

Novější generace bispecifických protilátek byly navrženy tak, aby se snížilo riziko komplikací pozorovaných u aplikace původního BiTE formátu. Ve své struktuře zahrnují Fc fragment, který prodlužuje jejich plasmatický poločas a zjednodušuje aplikační schémata. Na druhou stranu, přítomnost Fc fragmentu může díky vazbě na Fcγ receptor a C1q interakci vést k off-target toxicitě, především CRS a hepatotoxicitě. Proto je Fc doména v těchto nových konstruktech obvykle inaktivována (např. cílenou mutací), často tak, aby se zachovala její vazba na neonatální Fc receptor, což opět zlepšuje farmakokinetické vlastnosti [1]. Vedle modifikací Fc fragmentu je lepšího bezpečnostního profilu dosaženo i postupnou eskalací dávkování či případnou kombinací s jinými léčivy, např. obinutuzumabem, aby došlo k redukci cirkulujících buněk s cílovým antigenem, kterých vysoký počet v periferní krvi se považuje za rizikový faktor některých nežádoucích účinků [7]. Mezi bsAb novější generace patří např. glofitamab, mosunetuzumab, odronextamab, či epcoritamab.

### MOSUNETUZUMAB

Mosunetuzumab (RG7828, BTCT4465A) je plně humanizovaná IgG1 bsAb cílená na CD20 a CD3 s modifikovanou doménou Fc. V předklinických studiích tato modifikace Fc domény s výslednou inaktivací ADCC neohrozila cytoto-

xickou účinnost mosunetuzumabu [5]. Průběžné výsledky klinické studie fáze I / Ib u pacientů s R/R B-NHL (GO29781, NCT02500407) prokázaly dosažení ORR a CR u 42,2 % a 18,6 % pacientů s agresivním B-NHL (n = 119) a u 64,1 % a 34,1 % pacientů s indolentním B-NHL (n = 64); trvalá odpověď byla pozorována i u pacientů s relapsem po terapii CAR T-lymfocyty. Postupná eskalace dávkování mosunetuzumabu během 1. cyklu očekávaně zlepšila bezpečnost terapie a umožnila dosažení vyšších, potenciálně účinnějších dávek. Nežádoucí účinky související s léčbou (CRS a neurotoxicita) byly mírné a většina se objevila v 1. Cyklu [6]. Mosunetuzumab je v současné době testován v několika klinických studiích u pacientů s R/R B-NHL, a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s chemoterapií, s protilátkami konjugovanými s léčivem, check-point inhibitory nebo lenalidomidem (tab. 1).

### GLOFITAMAB

Glofitamab (RG6026, RO7082859) je trivalentní bsAb cílená na CD20 a CD3. Obsahuje tři oblasti Fab (1× CD3, 2× CD20) a modifikovanou doménu Fc. Dvě vazebná místa pro CD20 umožňují vyšší aviditu glofitamabu pro tento antigen i při nízkých aplikačních dávkách. První multicentrická studie fáze I (NP30179, NCT03075696) zahrnovala pacienty s R/R DLBCL, R/R primární mediastinální lymfom (PMBL), R/R trFL a s R/R FL. Všem pacientům byl 7 dní před glofitamabem aplikován obinutuzumab. Tento terapeutický přístup je založen na preklinických datech, která naznačují, že podání obinutuzumabu zmenšuje riziko toxicity díky snížení počtu B-buněk přítomných v periferní krvi. U 76 pacientů s agresivním R/R B-NHL (DLBCL, PMBL, trFL) léčených různými eskalačními protokoly byla ORR a CR 46 %, respektive 29 %. V kohortě pacientů s R/R FL byla ORR 63 % (50 % CR). Toxicita byla nízká, terapeuticky dobře zvládnutelná, přičemž stupeň CRS ≥ 3 byl hlášen pouze u 5 % pacientů; nebyla zaznamenána závažná neurotoxicita [7]. Medián PFS v agresiv-

ních a indolentních souborech pacientů byl 2,9, respektive 14,9 měsíce. Kompletní remise byly obvykle dosaženy po 3 cyklech a byly dlouhodobé. V klinickém hodnocení je aktuálně srovnání glofitamabu vs. rituximabu v kombinaci s gemcitabinem a oxaliplatinou u pacientů s R/R DLBCL, či kombinace glofitamabu s check-point inhibitorem, polatumab-vedotinem nebo lenalidomidem (tab. 1).

### ODRONEXTAMAB

Odronextamab (REGN1979) je anti-CD20×CD3 bsAb se strukturou založenou na IgG4 s modifikovanou Fc doménou. Studie fáze 1 s eskalací dávky zahrnující pacienty s R/R B-NHL (DLBCL, FL, MCL, jiný B-NHL; včetně pacientů, u nichž selhala předchozí léčba CAR T-lymfocyty) neprokázala žádnou toxicitu omezující dávku. Odpovědi byly závislé na dávce s ORR v rozmezí od 15 % do 100 %, přičemž pro indukci odpovědi u pacientů s FL byly zapotřebí nižší dávky odronextamabu ve srovnání s pacienty s DLBCL [8]. CRS stupně ≥ 3 a neurotoxicita byly hlášeny u 7 %, resp. 3 % pacientů, neurologické nežádoucí účinky stupně 4–5 nebyly pozorovány. Následující studie tyto výsledky potvrdily. U pacientů s R/R FL léčených dávkou 5mg a více byly ORR a CR 92,9 %, resp. 75 % s mediánem trvání odpovědi 7,7 měsíců; u pacientů s R/R DLBCL byla potřebná vyšší cílová dávka – při dávce 80 mg a více bylo dosaženo ORR a CR u 60 % s trváním odpovědi 10,3 měsíců. Odpovědi bylo dosaženo i u pacientů s DLBCL refrakterních na předchozí CAR T-lymfo terapii (n = 21), kdy bylo dosaženo ORR a CR u 33,3 resp. 23,8 % s trváním odpovědi 2,8 měsíců (4,4 měsíců u pacientů s CR) [9]).

### EPCORITAMAB

Epcoritamab (GEN3013) je bsAb rovněž cílená proti CD20 a CD3 založená na struktuře IgG1 s možností subkutánního podávání. Aktuálně publikovaná data ze studie fáze 1 s pacienty s R/R DLBCL a R/R FL (n = 58) konstatují příz-

**Tab. 1. Vybrané klinické studie hodnotící mosenutuzumab, glofitamab, epcoritamab a odronextamab v terapii B-non-hodgkinských lymfomů (B-NHL).**

terapeutická kombinace	cílové antigeny BsAb	onemocnění	fáze	předpokládaný čas ukončení	clinical trial identifikátor
mosenutuzumab± atezolizumab	CD20 / CD3	R/R B-NHL a CLL	I/II	11/2023	NCT02500407
mosenutuzumab + polatuzumab vedotin vs. Pola-BR	CD20 / CD3	R/R DLBCL, R/R FL	Ib/II	04/2024	NCT03671018
mosetuzumab + lenalidomide, glofitamab + lenalidomide, glofitamab + obinutuzumab + lenalidomide	CD20 / CD3	R/R FL	I/II	06/2024	NCT04246086
mosenutuzumab + CHOP, mosenutuzumab + polatuzumab vedotin + CHP	CD20 / CD3	nová dg DLBCL, R/R DLBCL	Ib/II	06/2022	NCT03677141
mosenutuzumab, mosenutuzumab + polatuzumab vedotin	CD20 / CD3	nová dg DLBCL, DLBCL bez nedosažení CR po 1. linii terapie	I/II	02/2024	NCT03677154
mosenutuzumab nebo glofitamab + GemOx	CD20 / CD3	R/R DLBCL, R/R HGBL	I	09/2021	NCT04313608
mosenutuzumab, glofitamab + obinutuzumab	CD20 / CD3	R/R B-NHL po aplikaci CAR T-lymfo	II	12/2023	NCT04889716
glofitamab + R-CHOP nebo Pola-CHP	CD20 / CD3	1. linie pro high-risk DLBCL nebo HGBL	I/II	01/2024	NCT04914741
glofitamab + atezolizumab nebo polatuzumab vedotin s obinutuzumabem	CD20 / CD3	R/R B-NHL	Ib	08/2021	NCT03533283
glofitamab + rituximab nebo obinutuzumab + CHOP	CD20 / CD3	nová dg B-NHL, R/R B-NHL	I	12/2023	NCT03467373
glofitamab + RO7227166 + obinutuzumab	CD20 / CD3 + CD19 / 4-1BB	R/R B-NHL	I	01/2023	NCT04077723
epcoritamab	CD20 / CD3	R/R DLBCL, HGBL, FL, PMBL, MCL, SLL, MZL	I/II	12/2025	NCT03625037
epcoritamab + R-CHOP nebo R2 nebo BR nebo GemOx	CD20 / CD3	nová dg DLBCL a FL, R/R DLBCL a FL	I/II	09/2024	NCT04663347
epcoritamab vs. volba investigátora	CD20 / CD3	R/R DLBCL	III	05/24	NCT04628494
odronextamab	CD20 / CD3	R/R DLBCL, FL, MZL, MCL	II	08/2026	NCT03888105

CLL – chronický lymfocytární leukémie, FL – folikulární lymfom, HGBL – high-grade B-NHL, SLL – lymfom z malých lymfocytů, PMBL – primární mediastinální B-lymfom, MCL – Mantle cell lymfom, MZL – lymfom z marginální zóny, R/R – relabovaný nebo refrakterní

nivý bezpečnostní profil s nízkým rizikem nežádoucích účinků (CRS u 56,9 % pacientů, maximálně 2. stupně; neurotoxicita u 6,9 % pacientů) i efektivitu s dosažením ORR a CR u 60 %, resp. 20 % pacientů s DLBCL a 85,7 % u FL (0 % CR), opět s nižší potřebnou dávkou k dosažení odpovědi u pacientů s FL [10].

## DALŠÍ MOŽNOSTI STIMULACE

Většina aktuálně klinicky dostupných produktů představuje anti-CD20/CD3 bsAb. Alternativní nadějně bsAbs jsou založené na kostimulaci

4-1BBL/CD19 (RG6076), či na cílení jiných imunokompetentních buněk, jako jsou NK-buňky. Cílovým Ag na NK-buňkách je především CD16A schopný indukovat aktivaci NK-buněk i bez další kostimulace. V klinickém testování je aktuálně produkt AFM13, což je anti-CD30/CD16 tetravalentní bsAb, jehož bezpečnost a efektivita je v současnosti předmětem studií v terapii pacientů s R/R T-NHL (vč. transformované mycosis fungoides) i v léčbě pacientů s Hodgkinovým lymfomem.

V klinickém hodnocení jsou pak i kombinace bsAb s dalšími imunomodula-

cii, jako check-point inhibitory, lenalidomid, či jiné bsAb (např. výše zmíněné RG6076) ve snaze zvýšit rekrutaci a stimulaci T-lymfocytů či zabránit jejich exhausci. Tyto přístupy pak umožňují terapii i u pacientů s vysokým rizikem refrakternosti k terapii např. v důsledku přítomnosti známých faktorů rezistence.

## Literatura

1. Labrijn AF et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat Rev Drug Discov.* 2019.
2. Pytlík R et al. Current Immunotherapy Approaches in Non-Hodgkin Lymphomas. *Vaccines (Basel).* 2020.

3. Salvaris R et al. Bispecific Antibodies: A Review of Development, Clinical Efficacy and Toxicity in B-Cell Lymphomas. *Pers Med*. 2021.
4. Lussana F. et al. Immunotherapy of Acute Lymphoblastic leukemia an Lymphoma With T Cell-Redirected Bispecific Antibodies. *J Clin Oncol*. 2021.
5. Ferl GZ et al. A Preclinical Population Pharmacokinetic Model for Anti-CD20/CD3 T-Cell-Dependent Bispecific Antibodies. *Clin Transl Sci*. 2018.
6. Schuster SJ et al. Mosunetuzumab Induces Complete Remissions in Poor Prognosis Non-Hodgkin Lymphoma Patients, Including Those Who Are Resistant to or Relapsing After Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapies, and Is Active in Treatment through Multiple Lines. *Blood* 2019.
7. Dickinson MJ et al. CD20-TCB (RG6026), a novel "2:1" format T-cell-engaging bispecific antibody, induces complete remissions in relapsed/refractory B-cell non-Hodgkins lymphoma. *Hematological Oncology* 2019.
8. Bannerji R et al. Clinical Activity of REGN1979, a Bispecific Human, Anti-CD20 x Anti-CD3 Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory (R/R) B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL). *Blood* 2019.
9. Annerji R et al. Odronextamab (REGN1979), a Human CD20 x CD3 Bispecific Antibody, Induces Durable, Complete Responses in Patients with Highly Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma, Including Patients Refractory to CAR T Therapy. *Blood*. 2020.
10. Hutchings M et al. Epcoritamab (GEN3013; DuoBody-CD3xCD20) to induce complete response in patients with relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL): Complete dose escalation data and efficacy results from a phase I/II trial. *J Clin Oncol*. 2020

## Inhibitory imunitních kontrolních bodů v léčbě lymfomů

Kořen J.

1. interní klinika – klinika hematologie, 1. LF UK a VFN v Praze

### ÚVOD

Rozvoj imunoterapie a její použití v klinické praxi se v posledních dvou dekáдах podílí zásadním způsobem na zlepšení výsledků léčby jak Ne-Hodgkinových lymfomů (NHL), tak i Hodgkinova lymfomu (HL). Její význam v posledních několika letech nadále rychle narůstá se zaváděním nových typů této léčby, jako jsou inhibitory imunitních kontrolních bodů (IKB), bispecifické protilátky, nebo geneticky modifikované T lymfocyty s chimerickým antigenním receptorem.

### MECHANIZMUS ÚČINKU

Únik lymfomových buněk z imunitního dohledu představuje jeden ze zásadních mechanismů jejich přežití. Účinná reakce efektorových T lymfocytů představuje komplexní proces, který vyžaduje jednak rozeznání imunogenního antigenu na povrchu antigen prezentujících buněk (APC) v souvislosti s hlavním histokompatibilním systémem (MHC) T buněčným receptorem, a dále následnou aktivací pomocí kostimulačních signálů. Pouze tento komplexní proces umožní aktivaci, diferenciaci a expanzi efektorových T lymfocytů. Imunitní

reakce je následně modifikována řadou imunitních kontrolních bodů na povrchu T lymfocytů, které zajišťují rovnováhu mezi dostatečnou imunitní odpovědí a nežádoucí cytotoxickou reakcí po eliminaci hrozby. Tohoto mechanismu však využívají nádorové buňky a buňky nádorového mikroprostředí, které produkují ligandy inhibičních receptorů kontrolních bodů, což vede k potlačení T buněčné reakce a přispívá k imunotoleranci nádoru.

Jako klinicky nejúspěšnější koncept při terapeutickém využití tohoto mechanismu se ukázaly blokátory inhibičních imunitních kontrolních bodů, jako jsou CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen*) a zejména inhibitory PD-1 (*programmed cell death protein*). Význam této léčebné modalitě dokumentuje rychle narůstající počet registrovaných indikací pro léčbu nádorů a podtrhuje také skutečnost, že za objev využití IKB v onkologii byla v roce 2018 udělena Nobelova cena za fyziologii Jamesovi P. Allisonovi a Tasuku Honjovi.

V léčbě lymfomů se dosud ukázaly jako nejúčinnější inhibitory PD-1, proto budou dále zmíněny podrobně. Blokáda dalších inhibičních IKB, jako CTLA-4, nebo LAG-3 (*lymphocyte activation*

gene3) v časných klinických studiích nepřinesla přesvědčivé výsledky.

### PD-1 INHIBITORY

Klinický benefit PD-1 inhibitorů se významně liší mezi jednotlivými typy lymfomů. Největší účinnost, včetně dlouho trvajících odpovědí, byla zaznamenána u pacientů s HL, zatímco u pacientů s NHL byly výsledky této léčby celkově podstatně horší.

Tento zásadní rozdíl v klinické účinnosti je přičítán zejména rozdílné expresi ligandů proteinu PD-1 (PD-L1, PD-L2) na povrchu nádorových buněk a také vlivu nádorového mikroprostředí. Zdá se, že nejlepší klinický efekt mají PD-1 inhibitory u lymfomů s geneticky nebo virově podmíněnou zvýšenou expresí PD-L1, PD-L2. Díky pravidelně se vyskytující genové amplifikaci nebo nadpočetným kopiím lokusu 9p24.1 u HL dochází k výrazně zvýšené expresi PD-L1 a PD-L2 na povrchu nádorových buněk. Dalším faktorem, který může způsobit zvýšenou expresi PD-L1, PD-L2, je přítomnost genomu EBV v nádorových buňkách, která vede k aktivaci JAK/STAT signální dráhy a ve svém důsledku ke zvýšení exprese PD-1 ligand.

Tab. 1. Výsledky vybraných PD-1 inhibitorů v léčbě R/R Hodgkinova lymfomu.

	studie fáze	počet pacientů	ORR (%)	CR (%)	PFS	odkaz
nivolumab	I	23	87	17	86 % v 6 měsících	Ansell SM, 2015 [1]
nivolumab	II	243	69	16	medián 14,4 měsíců	Armand P, 2018 [2]
pembrolizumab	I	31	65	16	46 % ve 12 měsících	Armand, 2016 [3]
pembrolizumab	II	210	72	27,6	medián 13,7 měsíců	Chen R, 2018 [4]
sintilimab	II	96	85,4	29	78 % v 6 měsících	Su H, 2019 [5]
tislelizumab	II	70	87	63	75 % v 9 měsících	Song Y, 2020 [6]

## HODKGINŮV LYMFOM – KLINICKÉ VÝSLEDKY

### Nivolumab u R/R HL

Nivolumab je humánní monoklonální protilátka proti PD-1. V první studii fáze I byl testován v monoterapii na skupině 23 pacientů s refrakterním nebo relabující (R/R) HL, 65 % pacientů bylo po selhání předchozí autologní transplantace kmenových buněk (ASCT) a po brentuximab vedotinu (BV). Celkový poměr odpovědi (overall response rate, ORR) byl 87 %, kompletní remise (CR) dosáhlo 16 % pacientů. Přežití do progresu (PFS) bylo 84 % v 6 měsících [1]. Následující studie fáze II (CheckMate 205) [2] potvrdila dobré výsledky monoterapie Nivolumabem u skupiny R/R HL. Zařazeno bylo celkem 243 pacientů hodnocených ve 3 kohortách, 63 pacientů bylo dosud bez léčby BV (kohorta A), 80 pacientů bylo po ASCT a následně BV (kohorta B) a 100 pacientů dostalo BV před nebo po ASCT (kohorta C). Celkový ORR v celé skupině byl 69 %, CR dosáhlo 16 % pacientů. ORR v kohortách A, B, C byl 65 %, 68 %, 73 % a CR 29 %, 13 %, 12 %. Medián PFS byl 14,7 měsíce. Na základě této studie byl Nivolumab registrován pro R/R HL.

### Pembrolizumab u R/R HL

Pembrolizumab je humanizovaná protilátka proti PD-1. Při klinickém testování u pacientů s R/R HL bylo dosaženo srovnatelných výsledků jako u Nivolumabu. V klinické studii fáze I (Keynote-013) [3] bylo hodnoceno 31 pacientů s R/R HL, 71 % bylo po předchozí ASCT. ORR byl 65 %, CR 16 %, 70 % odpovědi trvalo déle

než 6 měsíců. PFS v 1 roce bylo 46 %. V následující studii fáze II (Keynote 087) [4] bylo hodnoceno 210 pacientů, opět ve 3 kohortách, 69 pacientů progredovalo po ASCT a BV (kohorta 1), 81 bylo po záchranné léčbě a BV, ale nebyli únosní ASCT (kohorta 2) a 60 pacientů po ASCT bez léčby BV (kohorta 3). Celkový ORR byl 71,9 %, CR 27,6 %. Medián PFS 13,7 měsíce. ORR v jednotlivých kohortách 1, 2 a 3 byl 74 %, 64 % a 70 %. Tato studie rovněž vedla k registraci Pembrolizumabu pro indikaci R/R HL, nicméně v ČR nemá v současné době stanovenou úhradu z veřejného pojištění.

### Další PD-1 inhibitory

V poslední době byla publikována data účinnosti několika dalších anti PD-1 protilátek testovaných u pacientů s R/R HL, které vykazují rovněž velmi dobré výsledky. Srovnání výsledků je v tab. 1.

### PD-1 inhibitory v časnějších fázích léčby HL

Velmi dobré výsledky PD-1 inhibitorů ve skupině R/R HL, kde již představují standardní možnost léčby, vedly dále k testování jejich použití v časnějších fázích léčby v kombinaci s dalšími léky.

Ve studii fáze I–II byla testována u 91 pacientů s HL jako první záchranná léčba kombinace Nivolumab + BV, 4 cykly, 84 pacientů následně podstoupilo ASCT [7]. ORR byl 85 %, CR 67 %. Při mediánu sledování 34 měsíců je PFS ve 3 letech 77 % v celé skupině, u pacientů s provedenou ASCT přímo po této léčbě 91 %. Celkové přežití v celé skupině bylo ve 3 letech 93 %.

U nově diagnostikovaných pacientů s pokročilým stadiem HL byla testována kombinace Nivolumab + AVD (kohorta D CheckMate 205) [8], ve skupině 51 pacientů byl na konci léčby ORR 84 %, CR 67 %. PFS v 9 měsících 92 %.

## NE-HODKGINOVY LYMFOMY – KLINICKÉ VÝSLEDKY

Ve srovnání s výsledky léčby PD-1 inhibitory u HL jsou výsledky léčby u pacientů s NHL v neselektovaných souborech podstatně horší. Výraznější efekt byl pozorován pouze ve skupinách pacientů s lymfomy s genetickou amplifikací 9p24.1., jako jsou primární mediastinální B lymfom (PMBL), lymfom šedé zóny (GZL), primární CNS lymfom (PCNSL), primární testikulární lymfom (PTL), nebo některé EBV pozitivní lymfomy.

Přehled a srovnání výsledků vybraných klinických studií zobrazuje tab. 2.

### NHL s amplifikací 9p24.1.

PMBL tvoří asi 6 % z případů DLBCL. V řadě ohledů, jako jsou lokalita postižení, mladší věk pacientů a rovněž profil genové exprese, se jedná o lymfom podobný HL. Ve studii fáze I bylo hodnoceno 21 pacientů s R/R PMBL monoterapií Pembrolizumabem, ORR byl 48 %, CR 33 %, při mediánu sledování 29 měsíců nebylo dosaženo mediánu trvání odpovědi (DOR) Nikdo z pacientů s CR neprogredoval po dobu sledování [9]. Další studie fáze II, která navázala a potvrdila tyto výsledky, bylo léčeno Pembrolizumabem 53 pacientů s R/R PMBL, ORR byl 45 %, CR 13 %, mediánu DOR

Tab. 2. Výsledky vybraných studií inhibitorů imunitních kontrolních bodů u NHL.

	studie fáze	počet pacientů	diagnóza	ORR (%)	CR (%)	PFS	odkaz
<b>monoterapie</b>							
nivolumab	I	31	R/R B-NHL	26	10	medián 6 m	Lesokhin AM, 2016 [18]
		23	R/R T-NHL	17	0	medián 2,5 m	
nivolumab	II	121	R/R DLBCL + t1NHL				
			ASCT R/R	10	3	medián 1,9 m	Ansell SM, 2019 [11]
			ASCT neunosni	3	0	medián 1,4 m	
nivolumab		5	4x R/R PCNSL, 1x PTL	100	80	NA	Nayak, 2017 [10]
pembrolizumab	I	21	R/R PMBL	48	33	NA	Armand, 2019 [9]
pembrolizumab	II	53	R/R PMBL	45	13	NA	Armand, 2019 [9]
pembrolizumab	II	23	R/R FL, LPL, MZL	17	0	medián 3,5 m	Ding, 2017 [15]
pembrolizumab	II	24	R/R MF + SS	38	8	ve 12 m 69 %	Khodadoust, 2020 [19]
<b>kombinovaná léčba</b>							
atezolizumab (anti PD-1) + obinutuzumab	Ib	23	R/R DLBCL	16	NA	NA	Palomba, 2017 [16]
		26	R/R FL	57	NA	NA	
pembrolizumab + rituximab	II	27	R/R FL	80	60	NA	Nastoupil, 2017 [17]
anti CD47 (Hu5F9) + rituximab	Ib/II	15	R/R DLBCL	40	27	NA	Advani, 2018 [13]
		7	R/R FL	71	43	NA	

nebylo dosaženo při mediánu sledování 12,5 měsíce [9].

Další nadějně výsledky byly publikovány na malém souboru pacientů s R/R PCNSL a PTL léčených Nivolumabem [10]. Jednalo se o 4 pacientky s PCNSL a 1 s PTL, všichni pacienti dosáhli léčebné odpovědi, 4 CR, 1 PR, 3 z nich byli bez progresu při posledním sledování ve 13–17 měsíci léčby.

### DLBCL

Výsledky monoterapie PD1 inhibitory byly neuspokojivé. Ve studii fáze II (CHECKMATE –139) [11] bylo léčeno Nivolumabem 121 pacientů s R/R DLBCL, buď selhávající po ASCT, nebo ASCT neúspěšní. ORR u pacientů po ASCT byl 10 % u ostatních 3 %. Podobně ve studii s Pembrolizumabem, indikovaným jako konsolidace po ASCT s cílem zlepšit PFS v 18 měsících o 20 % (60–80 %), nebyl pozitivní účinek prokázán dle cíle studie [12].

Ani kombinace PD-1 inhibitorů s dalšími léky, jako jsou CTLA4 inhibitor (ipi-

limumab), ibrutinib či obinutuzumab, nevedly u R/R DLBCL k přesvědčivým výsledkům.

Naproti tomu nadějně výsledky mělo použití inhibitoru IKB přirozené imunity CD47, ovlivňující funkci makrofágů a monocytů. Zvýšená exprese CD47 a jeho ligady SIRP $\alpha$  vede k inhibici na protilátce závislé, buněčně zprostředkované fagocytózy. Ve studii fáze I byla testována u 15 pacientů s R/R DLBCL protilátka anti-CD47 (Hu5F9-G4) v kombinaci s rituximabem, ORR byl 40 %, CR 27 % [13].

### Folikulární lymfom a další indolentní lymfomy

U FL a dalších indolentních lymfomů nevedla monoterapie PD1 inhibitory k výraznějšímu efektu. Ve studii fáze II (CHECKMATE-140) [14] bylo léčeno Nivolumabem 93 pacientů s R/R FL, ORR byl pouze 4 %, medián PFS jen 2,2 měsíce. Ve studii s Pembrolizumabem, kam bylo zařazeno 23 pacientů s R/R indolentními lymfomy, dosáhli od-

povědi jen 2 pacienti z 18 s FL, medián PFS v celé studii byl zhruba 3 až 4 měsíce [15].

Nicméně kombinovaná léčba inhibitorů IKB s cílenou proti lymfomovou léčbou ukázala nadějnější výsledky. Kombinace atezolizumabu (anti PD-1) a obinutuzumabu (anti CD20) ve skupině 26 pacientů s R/R FL prokázala ORR u 57 % pacientů [16]. Pembrolizumab v kombinaci s rituximabem u R/R FL ve skupině 27 pacientů měl ORR 80 %, CR 60 %, mediánu PFS nebylo dosaženo při sledování 7 měsíců [17].

### T-NHL

Ve skupině periferních T-NHL byla zaznamenána vyšší účinnost PD-1 inhibitorů pouze u některých jednotek z této skupiny. Nadějně výsledky ukázala studie fáze II, kde bylo léčeno Pembrolizumabem 24 pacientů s pokročilým kožním R/R T-lymfomem (mycosis fungoides nebo Sézaryho syndromem), bylo dosaženo ORR 38 %, CR 8 %, PFS v 1 roce byl 69 % [19].



## ZÁVĚR

PD-1 inhibitory představují vysoce účinnou metodu léčby zejména u pacientů s HL, kde se již staly pevnou součástí léčby u R/R forem onemocnění, zejména po selhání záchranné chemoterapie a ASCT. Jejich optimální využití v časnějších fázích léčby HL je nadále předmětem klinického zkoumání. U pacientů s NHL je monoterapie PD-1 inhibitory účinná jen u vybraných podskupin, jako jsou lymfomy s genetickou amplifikací 9p24.1. V dalším výhledu se očekávají výsledky nových typů inhibitorů IKB a dále kombinované léčby zahrnující další cílenou léčbu lymfomů, případně chemoterapii.

## Literatura

1. Ansell SM, et al: PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2015;372:311–319.
2. Armand P, et al. Nivolumab for relapsed/refractory classic Hodgkin lymphoma after failure of autologous hematopoietic cell transplantation: extended follow-up of the Multicohort Single-Arm Phase II CheckMate 205 Trial. *J Clin Oncol.* 2018;36(14):1428–1439.
3. Armand P, et al. Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. *J Clin Oncol.* 2016;34(31):3733–3739.
4. Chen R, et al. Pembrolizumab in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: 2-year follow-up of KEYNOTE-087. *Blood.* 2019;134(14):1144–1153.
5. Su H, et al: Sintilimab for relapsed/refractory classical Hodgkin's lymphoma: Extended follow-up on the multicenter, single-arm phase II ORIENT-1 study. *J Clin Oncol* 37, 2019 (abstr 7533).
6. Song Y, et al: Treatment of relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma with the anti-PD-1, tislelizumab: Results of a phase 2, singlearm, multicenter study. *Leukemia.* 2020;34:533–542.
7. Moskowitz AJ, et al. Brentuximab vedotin and nivolumab for relapsed or refractory classic Hodgkin lymphoma: long-term follow-up results from the Single-Arm Phase 1/2 Study. *Blood.* 2019;134(Supplement\_1):238.
8. Ramchandren R, et al. Nivolumab for newly diagnosed advanced-stage classic Hodgkin lymphoma: safety and efficacy in the Phase II CheckMate 205 Study. *J Clin Oncol.* 2019;37(23):1997–2007.
9. Armand P, et al. Pembrolizumab in relapsed or refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2019;37(34):3291–3299.
10. Nayak L, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. *Blood.* 2017;129(23):3071–3073.
11. Ansell SM, et al. Nivolumab for relapsed/refractory diffuse large B-Cell lymphoma in patients ineligible for or having failed autologous transplantation: a single-arm, phase II study. *J Clin Oncol.* 2019;37(6):481–489.
12. Frigault MJ, et al. PD-1 blockade for diffuse large B-cell lymphoma after autologous stem cell transplantation. *Blood Adv.* 2020;4(1):122–126. doi:10.1182/bloodadvances.2019000784.
13. Advani R, et al. CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine.* 2018;379(18):1711–1721.
14. Armand P, et al. Efficacy and safety results from CheckMate 140, a phase 2 study of nivolumab for relapsed/refractory follicular lymphoma. *Blood,* 2020.
15. Ding W, et al. PD-1 blockade with pembrolizumab in relapsed low grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2017;130:4055.
16. Palomba ML, et al. A phase IB study evaluating the safety and clinical activity of atezolizumab combined with obinutuzumab in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Hematological Oncology* 2017;35:137–138.
17. Nastoupil LJ, et al. High response rates with pembrolizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: interim results of an ON open-label, phase II study. *Hematological Oncology* 2017;35:120–121.
18. Lesokhin AM, et al. Nivolumab in Patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: preliminary results of a phase Ib study. *J Clin Oncol.* 2016;34(23):2698–2704.
19. Khodadoust MS, et al. Pembrolizumab in relapsed and refractory mycosis fungoides and Sézary syndrome: A multicenter phase II study. *Journal of Clinical Oncology*;38(1):20–28.

# Patogeneze CLL a vztah k cílené léčbě

Mráz M.

Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno  
CEITEC MU, Brno

## ÚVOD

U CLL došlo v posledních 15 letech k zásadnímu posunu v pochopení její patogeneze a následující shrnutí se věnuje trojici „molekulárních drah“, které úzce souvisí s její biologii a léčbou: 1) deregulace apoptózy; 2) BCR signalizace; 3) T buněčné interakce v mikroprostředí. Nejedná se o vyčerpávající přehled všech důležitých drah, ale spíše o osobní pohled (často spekulativní) na dráhy, které pravděpodobně mají výraznější význam u větší části CLL pacientů. Pochopení významu uvedených drah vedlo k zavedení BH3-mimetika venetoclaxu („BCL2 inhibitor“) a inhibitorů BCR signalizační dráhy (ibrutinib, idelalisib, acalabrutinib a další). Tato léčiva se stávají preferovanými terapeutickými přístupy díky své pozoruhodné účinnosti napříč spektrem CLL subtypů a zasahují dvě uvedené dráhy přímo (apoptóza a BCR). Interakce s T lymfocyty ovlivňují nepřímo.

## DEREGULACE APOPTÓZY

(Pre)nádorové buňky mohou volit různé strategie pro uplatnění svého maligního potenciálu, ale v případě maturovaných maligních B lymfocytů je pravděpodobně jejich primárním cílem obejít apoptózu. Toto vychází z fyziologie B lymfocytů, kterých denně vznikají desítky miliónů a ty zase záhy umírají. Ve své podstatě jsou B lymfocyty vybaveny schopností extrémního metabolického a proliferačního výkonu, neboť během infekce se snaží „konkurovat“ bakteriím a virům s vyšším replikačním potenciálem, ale jejich vlastní „kontrola“ probíhá na úrovni snadno indukovatelné apoptózy.

Pro regulaci apoptózy maturovaných B lymfocytů se zdá být zásadní především anti-apoptický protein BCL2 (resp.

jeho množství vůči pro-apoptickým členům stejné rodiny jako je BIM). Zisk vysokých hladin BCL2 se objevuje u několika příbuzných onemocnění (folikulární lymfom, DLBCL), kde je zapříčiněn nejčastěji jeho translokací s regulační oblastí pro těžký řetězec imunoglobulinu. U CLL se translokace BCL2 prakticky nevyskytují, ale buňky mají vysoké hladiny BCL2 proteinu. Prof. Carlo Croce, který BCL2 translokace popsal v 80. letech, se pokoušel dvě desetiletí pochopit mechanismus indukce BCL2 u CLL. V roce 2002 vyústilo toto snažení v objev dvou miRNA (miR-15a/16-1), která negativně regulují BCL2 a jsou lokalizovaná v oblasti 13q14, jejíž ztráta je přítomna u cca 50% CLL pacientů. Zůstává nejasné, jak je vysoká hladiny BCL2 zajištěna u CLL bez delecce 13q14, kteří mají hladiny miR-15/16 velmi vysoké. Ve skutečnosti i u CLL pacientů s 13q14 delecí představují miR-15/16 jedny z nejabundantnějších krátkých nekódujících RNA, což naznačuje, že nemusí být jediným klíčovým determinantem BCL2 hladin. Příběh lokusu 13q14 není uzavřen ani po vytvoření myšího modelu s delecí miR-15/16 vs. delecce větší chromozomální oblasti, tak jak je běžně ztracena u CLL. U každé z těchto geneticky upravených myší (tj. malá vs. větší delecce) se vyskytuje jiný vzájemný poměr vznikajících B buněčných malignit (CLL/MBL/lymfom) a liší se penetrance [1].

Z terapeutického hlediska je důležité, že CLL buňky jsou v zásadě univerzálně závislé na hladině BCL2 a použití BH3-mimetika venetoclaxu vede k buněčné smrti. Během léčby venetoclaxem byly popsány mutace v BCL2 (Gly-101Val), které cca 200× snižují sílu vazby léku k proteinu, což je klasickým obecným mechanismem rezistence na malé

molekuly. Také není asi překvapivé, že vznik rezistence na venetoclax může zahrnovat zvýšení hladin jiných anti-apoptických členů stejné rodiny, především BCLXL, který je indukován pomocí interakce CLL s T lymfocyty, resp. interleukiny, které produkují (např. IL4). Bylo také pozorováno, že při podání venetoclaxu a také BTK inhibitorů, dochází k selekci subklonů buněk s vyššími hladinami BCL2. To je výhodné např. pro kombinaci ibrutinibu s venetoclaxem, neboť ibrutinib činí CLL buňky ještě více dependentní na hladině BCL2. Proč není mechanismem rezistence na venetoclax u CLL nějaké obrovská indukce exprese BCL2? Zdá se, že indukovat BCL2 je v CLL buňce poměrně složité a nejrůznější testované solubilní molekuly (interleukiny, CD40, APRIL, BAFF) či BCR aktivace in vitro nejsou většinou schopny výrazně zvýšit jeho hladiny.

Z hlediska deregulace apoptózy je třeba u CLL také zmínit mutace genu pro p53, které se typicky vyskytují v kombinaci s delecí části chromozomu 17p13, kde je lokalizován TP53 gen. Protein p53 je zodpovědný za zástavu buněčného cyklu během poškození DNA, ale má také rozmanité metabolické funkce a mimo jiné je schopen negativně regulovat BCR dráhu [2]. Je zajímavé, že mutace p53 mají tzv. dominantně negativní efekt, tj. pro znefunkčnění homo-tetrameru p53 stačí mutace jedné alely, která vede k tvorbě deficientních tetramerů v 15 z 16 možných kombinací, i když druhá alela p53 je nepoškozená. Z tohoto důvodu cca 5 % CLL pacientů má p53 mutaci bez delecce 17q13, ale jenom minimum má delecí 17q13 bez mutace. Samotná delecce jedné alely p53 sice vede k mírně nižší genové dávce, ale tetramery jsou funkční. U CLL byly popsány

také p53 mutace se „ziskem funkce“, kdy specifické p53 mutace v určitých DNA vazebných motivech proteinu vedou asi k aberantní aktivaci genů, a ne jenom ztrátě funkce, jako je tomu u ostatních p53 mutací [3]. Aberace p53 predisponují ke špatné odpovědi na chemoimunoterapii/chemoterapii, ale nemají v zásadě vliv na iniciační odpověď na BCR inhibitory či venetoclax. Zároveň u cílené léčby vykazují pacienti s p53 inaktivací tendenci k rychlejší progresi, což v některých studiích bylo pozorováno se statistickou významností a v jiných pouze jako trend [4]. Bude jistě zajímavé pochopit, jak přesně p53 reguluje reakci/adaptaci CLL buněk na BCR inhibitory různých typů, tj. BTK vs. PI3K vs. SYK a na venetoclax.

V kontextu apoptózy je třeba také připomenout aberace ATM proteinu, který se podílí na detekci zlomu DNA, a další plejádu mutací genů, které byly popsány pomocí celoexomového sekvencování jako rekurentně mutované u CLL a také přímo (např. BIRC3) či nepřímo (SF3B1) související s regulací apoptózy CLL buněk.

## BCR AKTIVACE: PATOGENEM VS. AUTONOMNĚ

Dalším možným mechanismem přežití B buněk je aktivace BCR signalizace. Ve své podstatě přílišná aktivace BCR signalizace vede k apoptóze normálních B lymfocytů, což je obranný mechanismus vůči silné auto-reaktivitě, takže CLL buňka pro zisk anti-apoptické úrovně BCR signálu musí nastavit „přesně správnou“ hladinu signálu. Je známo, že u normálních B lymfocytů musí na jejich povrchu být přítomen funkční BCR receptor a tento pomocí tzv. tonické signalizace udržuje buňky při životě, i když v „systému“ není antigen z patogenu. U CLL existuje aberantní posílení podobné autonomní BCR aktivace, která souvisí se strukturou exprimovaného BCR receptoru [5], a navázal tak na pozorování z 90. let o významu struktury genu pro imunoglobulin u CLL. U CLL existují dva základní prognostické, ale také biologické

subtypy, které jsou dány přítomností somatických hypermutací (SHM) v těžkém řetězci pro imunoglobulin tzv. mutované a nemutované IGHV. Předpokládá se, že CLL buňky s nemutovaným IGHV pocházejí z buněk, které neměly šanci k interakci v germinálních centrech (GC), kde normálně probíhá SHM, zatímco CLL buňky s mutovaným IGHV jsou ty, u nichž vlivem interakcí v GC došlo k aktivaci AID a vnesení mutací. Je vlastně částečně překvapivé, že CLL pacienti s buňkami s mutovaným IGHV mají lepší prognózu, neboť je známo, že aktivita AID zvyšuje mutační potenciál a vede i k patogenním mutacím v jiných genech (jako je BCL6 či BCL2). Příkladem takové situace je folikulární lymfom, kde vysoká aktivita AID vede ke konstantnímu mutování IGHV a také dalších genů, což je jedním z mála známých prediktorů rizika transformace FL do DLBCL. Vysvětlením by mohlo být to, že u CLL nedochází k intenzivní „evoluci“ imunoglobulinu dalšími SHM mutacemi (existují výjimky), což naznačuje obecnou malou aktivitu AID. Také u CLL příliš nedochází k přesmyku imunoglobulinových tříd (cca 5–10 % pacientů), takže i u mutovaného IGHV má většina pacientů na povrchu nádorových buněk IgM. Některé výzkumy naznačily, že k přesmyku IgM do IgG dochází v intra-klonálních subpopulacích u pacientů, ale tyto buňky asi nemají významnou proliferační výhodu vůči zbytku klonu. Klíčem k pochopení těchto pozorování může být potřeba nepříliš silné BCR aktivace u CLL, což by mohlo vysvětlit i nízké hladiny BCR/IgM na povrchu CLL buněk ve srovnání s normálními maturovanými B lymfocyty. Možná, že CLL buňky se snaží nemít BCR dráhu příliš aktivní v kontextu cirkulace v periferní krvi, protože by to mohlo vést k jejich předčasné smrti, když „nezískají“ ko-stimulační signál od T lymfocytů. Naopak bylo popsáno, že při migraci CLL buněk do mikroprostředí lymfatických uzlin dojde k transkripční indukci BCR komponent [6] a zvýšení hladin dalších proteinů zapojených do BCR dráhy (např. CD20). Výsledným pozorováním

je pak aktivace množství genů, o nichž víme, že v normálních B buňkách podléhají kontrole BCR. Proč se toto tedy děje pouze v kontextu lymfatických uzlin, a nikoliv v periferní krvi či kostní dřeni? Klíčem je asi ko-stimulace od T lymfocytů, která je dostupná jen v uzlinách a má přirozenou úlohu balancovat aktivaci BCR tak, aby nevedla k apoptóze, ale naopak vedla k proliferaci a metabolické aktivaci buněk (viz kapitola níže). V současném okamžiku nelze říci, zda k aktivaci BCR v kontextu mikroprostředí lymfatických uzlin dochází antigenem, autoantigenem či jen na základě podpory autonomní BCR signalizace. Není vyloučeno, že toto se mění jednak v průběhu choroby a také nemusí být univerzální u všech pacientů, resp. liší se u pacientů dle IGHV statusu a struktury BCR.

Při popisu BCR dráhy nelze opomenout pozorování, že velká část CLL pacientů využívá specifické subgeny pro variabilní oblast imunoglobulinu, což někteří autoři vysvětlují jejich významem pro vazbu na autoantigen, oportunní patogen, či naopak významem pro antigen-nezávislou autonomní BCR aktivaci zprostředkovanou vazbou jednoho BCR k jinému BCR na membráně stejné buňky [5].

Velmi markantním důkazem pro význam BCR je například časté využití IGHV1-69 u CLL s nemutovaným IGHV, a dokonce specifický počet aminokyselin v oblasti IGH CDR3, která determinuje vazbu na „antigenní epitop“ a navíc párování IGH se specifickým lehkým řetězcem. Frekvence využití IGHV1-69 je u CLL nenáhodně vysoká, neboť i u věkově podobných zdravých osob není vidět tendence k akumulaci zdravých B lymfocytů s IGHV1-69. Tato pozorování vedla k domněnce, že u těchto CLL buněk je aktivace BCR možná přímo vazbou patogenu (Streptococcus/cytomegalovirus/HCV) nebo auto-antigenem. Dalším příkladem může být využití IGHV4-34 u pacientů s mutovaným IGHV, které možná vychází s obecně vyšší četností normálních B lymfocytů s tímto IGHV u starší populace. Stárnutí

imunitního systému vede k nenáhodným posunům a snížení míry polyklonality B lymfocytů. Je tedy častější využití IGHV4-34 jen náhoda či může být určitým předstupněm CLL? Možná samotné stárnutí imunitního systému přirozeně směřuje k fenotypu podobnému monoklonální B lymfocytóze (MBL), která byla popsána jako pre-klinické stádium CLL. MBL s tzv. nízkým počtem buněk bývá z IGHV mutovaných B buněk a nemívá IGHV1-69, což naznačuje, že se nejedná o prekuzory CLL s nemutovaným IGHV. Je pravděpodobnější, i když neprokázané, že předchází IGHV-mutovanému CLL, ale v naprosté většině těchto případů se „pacient“ nikdy nedožije klinicky manifestované CLL. Toto lze do jisté míry vnímat jako analogii ke stárnutí myeloidního systému, kde značné procento osob > 80–90 let má myeloidní buňky s mutacemi typickými pro AML, ale nemají myeloidní malignitu (a statisticky z důvodů věku dožití mít nebudou). Naopak, MBL s tzv. vysokým počtem B buněk (> 0,5×10<sup>9</sup>/l) má častěji nemutované IGHV, buňky mívají IGHV1-69 ve frekvencích podobných jako u CLL a takováto MBL jednoznačně častěji progreduje do diagnózy CLL. U MBL lze také najít některé typické aberace, jako je ztráta 13q14. Je zajímavé, že některé rekurentní CLL mutace byly popsány také přímo v kmenových CD34+ buňkách kostní dřeně CLL pacientů, což zůstává nevysvětleným fenoménem v kontextu předpokládaného vzniku malignity z maturovaných B buněk po opuštění kostní dřeně [7].

Mnohé o BCR dráze jsme se naučili při klinickém použití BCR inhibitorů, jako jsou ibrutinib a idelalisib. K překvapení mnohých se ukázalo, že BCR signalizace řídí migraci B buněk k chemokinům a také jejich adhezi. Podání ibrutinibu tak vede k lymfocytóze a také změně hladin desítek povrchových molekul, včetně některých notoricky zajímavých, jako jsou CD20, integrin VLA4, chemokinový receptor CXCR4 či samotný BCR. Například bylo popsáno zvýšení hladin BCR po ibrutinibu u CLL, což by nazna-

**Tab. 1. Přehled základních faktorů přítomných v mikroprostředí CLL.**

Receptor na CLL	Ligand	Zdroj ligandu v mikroprostředí
BAFF-R	BAFF	stromální b., NLC
BCMA, TACI	APRIL	stromální b., NLC
BCR	antigen?	patogen? apoptické b. (auto-antigen)?
CD38	CD31	stromální b., NLC
CD40	CD40L	T lymfocyty
CD44	hyaluronan	endoteliální a folikulární b.
CD100	plexin B1	prakticky všechny b.
CXCR4	CXCL12	stromální b., NLC
CXCR5	CXCL13	NLC, makrofágy
CCR7	CCL19/21	endoteliální b.
IFNGR	IFN $\gamma$	T lymfocyty
IL4R, IL21R, IL15R	IL4, IL21, IL15,	Tfh lymfocyty
ROR1	Wnt5a	stromální b.
VEGFR	VEGF	endoteliální a stromální b.
VLA4	VCAM1, fibronectin	stromální a endoteliální b.

čovalo, že přestalo docházet k interakci BCR s antigenem, neboť ten vede k internalizaci BCR a lze to vnímat jako nepřímý důkaz existence antigenu v mikroprostředí. Nicméně možným vysvětlením je také to, že ibrutinib přežívají spíše CLL buňky s vyšší hladinou BCR a nějakou zachovanou autonomní BCR signalizací obcházející BTK. Zároveň jsou tyto efekty časově proměnné a několik týdnů po nasazení ibrutinibu lze pozorovat nižší hladiny BCR [8], což je asi důsledkem nemožnosti CLL buněk migrovat do mikroprostředí, kde jsou faktory zvyšující hladiny BCR [6].

V tomto kontextu je zajímavou reakcí na ibrutinib kompenzatorní aktivace AKT dráhy [9]. CLL buňky, které nemohou migrovat do lymfatických uzlin, zvýší hladiny proteinu GAB1 a ten zabezpečí jejich přežití aktivací PI3K dráhy bez účasti BTK či nutnosti kontaktu CLL buněk v mikroprostředí lymfatických uzlin. U CLL buněk vystavených tlaku BCR inhibitoru jsou dále selektovány bodové i chromozomální aberace, které jim poskytují rezistenci k léčbě. Nejlépe popsánymi aberacemi je mutace PLC $\gamma$  obcházející BCR signalozom a mutace BTK bránící kovalentní vazbě ibrutinibu. Relativní re-

zistence k léčbě BCR inhibitory může nastat i negenetickým adaptivním mechanismem popsaným výše či zahrnujícím např. BCL2 či MAPK dráhu [10]. Zdá se, že tyto adaptivní mechanismy hrají roli spíše jen po dobu několika týdnů až měsíců po nasazení ibrutinibu a dají CLL buňkám časový prostor ke vzniku eventuální mutace vedoucí k plné rezistenci. V tomto ohledu je racionální hledat terapeutické kombinace, které povedou k eliminaci CLL buněk rychle a předejdou kompenzatorní adaptaci. Takovými kombinacemi může být například přidání venetoclaxu či GAB1 inhibitoru (Seda et al., Blood, 2021), ale naopak nepřiliš vhodné je přidání rituximabu, neboť ibrutinib významně snižuje hladiny CD20 [8].

### **ZÁVISLOST NA MIKROPROSTŘEDÍ: JSOU T LYMFOCYTY NEJDŮLEŽITĚJŠÍ?**

K CLL se dlouho přistupovalo jako k nemoci, která je způsobená prostou akumulací buněk s narušenou apoptózou. CLL buňky jsou sice málo proliferativní, ale existují zásadní intraklonální rozdíly, tj. CLL buňky v mikroprostředí lymfatických uzlin se dělí (alespoň několik %),

zatímco buňky v periferní krvi či kostní dřeni se nedělí téměř vůbec a „jen přežívají“ do doby, než se jim podaří znovu dostat do mikroprostředí uzlin. Tato pozorování vedla k hypotéze, že CLL buňky neustále recirkulují mezi periferní krví a sekundárními imunitními orgány, kde mají šanci se rozdělit. Nicméně samotný fenomén recirkulace byl experimentálně potvrzen jen částečně a jeho přesná regulace je intenzivně zkoumána [9].

CLL buňky jen nemigrují do mikroprostředí, ale umí jej spoluvytvářet a stimulovat okolní nenádorové buňky, aby jim poskytovaly potřebné signály. Mezi tyto podpůrné buňky patří stromální buňky, tzv. „nurse-like“ buňky (NLC) odvozené od monocytů, T-lymfocyty a NK buňky, folikulární dendritické buňky a endoteliální buňky. Každý tento buněčný typ může poskytnout leukemickým buňkám jiné kombinace signálů (TAB. 1) a je pravděpodobné, že u CLL pacientů existuje určitá variability v míře dependence na různých buněčných typech. Testování ko-kultivačních modelů a solubilních faktorů produkovaných v mikroprostředí vedlo mnohé k závěru, že klíčovými pro

proliferaci CLL buněk je interakce s T lymfocyty, resp. jimi produkovanými faktory, jako jsou CD40L, IL4 a IL21. Je zajímavé, že skoro každý testovaný solubilní faktor či buněčný typ umí podpořit přežití CLL buněk in vitro, ale de facto jen T lymfocytární signály umí indukovat množení CLL (především CD40). Dokonce ani aktivace BCR aktivace pomocí anti-IgM nevede k proliferaci CLL buněk (zde je však třeba zdůraznit, že aktivace není prováděna antigenem, neboť ten většinou neznáme). Bylo ale popsáno, že aktivace BCR signalizace vede k výrazněji silnější odpovědi CLL buněk na aktivaci CD40 ligandem [11]. Víme z biologie normálních B lymfocytů, že ideální proliferace B buněk v germinálním centru probíhá po synchronizované aktivaci BCR a CD40 dráhy. CLL buňky zdá se zůstávají závislé na této fyziologické regulaci. Je zajímavé, že ibrutinib jako léčivo, které ve své podstatě jen velmi málo indukuje apoptózu CLL buněk, je schopno zastavit jejich proliferaci a dochází k tomu právě nepřímo přes ovlivnění CD40 dráhy [11]. Z terapeutického hlediska by bylo jistě zajímavé se pokusit interakce s T-lym-

focyty blokovat přímo. Současně probíhají určité pokusy s protilátkou blokující CD40 dráhu u jiných B malignit. Stojí za povšimnutí, že fludarabin jako klasické chemoterapeutikum u CLL je vysoce toxické pro T lymfocyty, a tak například při použití FCR pravděpodobně dochází k výrazné depleci počtu T buněk, s nimiž mohou CLL buňky interagovat.

### Grantová podpora

Podpořeno Grantovou agenturou ČR (grant č. 20-025665). Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

### Literatura

1. Klein U, et al. *Cancer Cell*. 2010;17(1):28–40.
2. Cerna et al. *Leukemia*. 2019;33(2):403–414.
3. Trbusek et al. *J Clin Oncol*. 2011;29(19):2703–2708.
4. Munir et al., *Am J Hematol*. 2019;94(12):1353–1363
5. Dühren-von Minden et al. *Nature*. 2012;489(7415):309–312.
6. Guo B, et al. *Blood*. 2016;128(4):553–562.
7. Damm et al. *Cancer Discov*. 2014;4(9):1088–1101.
8. Pavlasova et al. *Blood*. 2016;128(12):1609–1613.
9. Seda et al. *Blood*. 2021;blood.2020008101.
10. Ondrisova L, Mraz M. 2020. *Front Oncol*: 10:591577.
11. Sharma et al. *Blood*. 2021;137(18):2481–2494.

## Význam prognostických a prediktivních biomarkerů u chronické lymfocytární leukémie

Papajík T., Urbánková H., Kriegová E.

*Hemato-onkologická klinika a Ústav imunologie, LF UP a FN Olomouc*

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastěji diagnostikovanou leukémií na západní polokouli. U většiny z nemocných (až 80 %) je dnes choroba objevena náhodně v rámci rutinního laboratorního testování. Počet případů narůstá s věkem, medián při diagnóze činí zhruba 70 let, více než 70 % nově diagnostikovaných nemocných je starších 65 let, ve věku nad 75 let je zjištěno přes 40 % případů. Nemocní jsou nej-

častěji zcela asymptomatictí, nacházejí se v počátečním stádiu choroby a většinou nevyžadují bezprostřední zahájení protinádorové terapie. Klinická různorodost projevů choroby v období diagnózy a zejména v následném období odráží biologickou různorodost populace nádorových buněk u jednotlivých pacientů. Výzkum genomu buněk CLL odhalil v posledních letech celou řadu změn, které pomohly pochopit pato-

genezi onemocnění, předpovědět jeho klinické chování, odpověd' na léčbu a odhadnout jeho pravděpodobnou prognózu. Zároveň byly vyvinuty a do každodenní praxe postupně uvedeny nové léčebné modalit, které dnes zásadně mění dříve zařité terapeutické algoritmy, umožňují účinnou léčbu prakticky všech věkových skupin nemocných a u řady z nich zásadně mění jejich prognózu. S příchodem nových cílených

léků a postupným nahrazením imunochemoterapie se v řadě situací, jak u relabovaných a refrakterních nemocných (R/R), tak i u dosud neléčených pacientů (TN), mění také význam jednotlivých prognostických a prediktivních biomarkerů, které máme k dispozici. Navíc jsou objevovány markery nové, které je třeba při cílené léčbě rychle inkorporovat do praxe. Proto je zapotřebí kontinuálně precizovat význam klíčových biomarkerů, a to jak z pohledu jejich prognostické hodnoty (zhodnocení prognózy jednotlivých skupin pacientů bez ohledu na typ jejich léčby), tak i z pohledu jejich prediktivního významu (informace o tom, zda marker přináší informaci o prospěšnosti specifického typu léčby a má tedy vliv na proces výběru terapie u konkrétního nemocného).

Ve kterých situacích jsou pro nás dnes biomarkery u CLL důležité?

1. Jak bylo uvedeno výše, naprostá většina nemocných je dnes diagnostikována v počátečním stádiu choroby, bez jakýchkoliv příznaků, a tudíž nevyžaduje bezprostřední léčebnou intervenci. U této velké skupiny pacientů je potřebné předpovědět biologické a klinické chování jejich onemocnění. Informace je důležitá jak pro pacienta a jeho blízké, tak i pro lékaře, který určí, s jakou frekvencí bude pacient sledován (watch and wait) a která vyšetření u něj budou realizována. Biomarkery (některé opakovaně odebrané a zhodnocené v určitém časovém úseku) mohou předpovědět, zda onemocnění bude v čase stálé, indolentní a bez potřeby protinádorové terapie, a zda nemocný bude mít pravděpodobnost dožití stejnou jako ostatní populace v jeho věku. V opačném případě pak biomarkery mohou zhodnotit, jestli progres CLL bude „lineární“ s postupným nárůstem velikosti nádorové masy a nutností zahájení léčby po delší době a po splnění obecně přijímaných kritérií aktivity choroby, nebo půjde o „exponenciální“ proliferaci a růst leukemické populace, situaci, která bude vyžadovat

v blízké době zahájení účinné protinádorové léčby. Navíc skupina nemocných v časném stádiu onemocnění s přítomností rizikových biologických faktorů je dnes předmětem výzkumu vlivu časnějšího zahájení moderní cílené terapie na prognózu onemocnění. Prognostický význam jednotlivých biomarkerů v této situaci je dnes detailně popsán (předpověď doby do zahájení léčby – TTFT), jelikož logicky nepodléhá změnám léčebných algoritmů. Biomarkery jsou dnes také stále častěji inkorporovány do prognostických indexů s cílem přesnější individuální předpovědi TTFT.

- Zhodnocení robustních biomarkerů před započítáním vlastní protinádorové terapie dnes nabývá na zásadním významu, a to jak ve smyslu prognostickém, tak i prediktivním. Jednotlivé biomarkery dnes dokáží predikovat účelnost a efektivitu zařazení cílené léčby, resp. kombinace cílených léků a monoklonálních protilátek do iniciačního terapeutického algoritmu, na druhé straně vyčlenit skupinu pacientů, která dosahuje obdobných léčebných výsledků při použití imunochemoterapie. Tímto personifikovaným přístupem můžeme optimalizovat výběr terapie tak, aby byla maximalizována její efektivita a minimalizována její toxicita s ohledem na přežití nemocných, a zároveň brána v potaz i její nákladová efektivita.
- U relabovaných a refrakterních pacientů již dnes prognostické a prediktivní biomarkery slouží v rutinní klinické praxi k výběru terapie novými molekulami a v blízké budoucnosti pomohou precizněji definovat nemocné vhodné k léčbě kombinacemi těchto léků.
- Nové biomarkery mohou také předpovědět neúčinnost či nízkou účinnost terapie novými molekulami nebo predikovat vývoj onemocnění v agresivnější formu (Richterova transformace).

Které prediktivní a prognostické biomarkery lze v současné době považovat

za klíčové a využít je v klinické praxi při volbě terapie nemocných s CLL?

a. **Mutační stav genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGHV).** Přítomnost somatických hypermutací *IGHV* neboli mutační stav *IGHV* dokáže do určité míry rozdělit CLL na dva základní podtypy onemocnění. Leukemické buňky s mutovaným *IGHV* (M-IGHV; rozdíl > 2 % oproti zárodečné nukleotidové sekvenci) charakterizují chorobu s výskytem příznivých genetických změn, malou nádorovou masou, klinicky stabilním, respektive indolentním průběhem, dobrou reakcí na imunochemoterapii a dlouhým celkovým přežitím (OS > 20 let). U velké skupiny mladších nemocných s M-IGHV bez přítomnosti dalších nepříznivých prognostických markerů, léčebných kombinací FCR je dosahováno plateau v přežití bez návratu onemocnění (PFS), které naznačuje kurativní potenciál této léčebné kombinace. Naproti tomu klon CLL s nemutovaným *IGHV* (UM-IGHV) má tendenci akumulovat nepříznivé genetické změny, chovat se výrazně agresivněji a leukemické buňky významně hůře reagují na imunochemoterapii, což se projevuje dosažením menšího počtu léčebných odpovědí, respektive jejich kratším trváním. S tím je spojen i postupný klonální vývoj choroby a znatelně kratší OS (≈ 8 let) při použití této léčby. Ve většině recentních klinických studií srovnávajících efekt imunochemoterapie s podáním cílené léčby samotné či v kombinaci s anti-CD20 monoklonálními protilátkami (nejčastěji s obinutuzumabem) u dosud neléčených nemocných dosahují pacienti s UM-IGHV výrazně lepších léčebných výsledků při použití inovativní cílené terapie – kinázových inhibitorů BCR signalizace (BCRi) či inhibitoru BCL2 proteinu (BCL2i), a to jak v počtu léčebných odpovědí, tak i v délce PFS. Mutační stav *IGHV* se tak stává významným prediktivním biomarkerem pro výběr iniciační terapie u nemocných s CLL.

- b. **Delece krátkých ramen chromozomu 17 a / nebo mutace genu TP53.** V době diagnózy choroby se inaktivace genu *TP53* (v důsledku delece 17p a / nebo mutace genu *TP53*) vyskytuje zhruba u 10 % jedinců, v době relapsu či progresu choroby u 30–40 % pacientů a v terminální fázi onemocnění či v Richterovy transformace až u 50–60 % nemocných. Inaktivace *TP53* je dnes bezesporu nejvýznamnějším a nejsilnějším prediktivním a zároveň prognostickým markerem u CLL. Díky inaktivaci *TP53* nedochází k apoptóze buněk po podání chemoterapie, což dokládá velmi nízký počet a zároveň malá hloubka léčebných odpovědí na všechny typy aplikované chemoterapie kombinované s podáním anti-CD20 protilátek (FCR, BR, G-CLB, aj.). Výsledkem uvedené léčby je také ve většině případů selekce agresivních subklonů choroby nesoucích tento defekt a klonální vývoj, který vede k rapidní progresi onemocnění (OS 3–5 let). Nález delece 17p (FISH) nebo mutace *TP53* (NGS) je dnes jednoznačnou indikací k podání BCRi či BCL2i, a to jak v iniciační léčbě, tak i při relapsu choroby (prediktivní význam). Nicméně i přes efektivitu těchto léků je patrné, že zvláště relabování nemocní s inaktivací *TP53* mají při monoterapii těmito molekulami prognózu horší než jedinci s funkční dráhou *TP53* (prognostický význam). Zřejmě až kombinace BCRi, BCL2i a monoklonálních protilátek může vést k ještě dramatictějšímu zlepšení prognózy u těchto vysoce rizikových nemocných.
- c. **Delece dlouhých ramen chromozomu 11 a/nebo mutace genů ATM a BIRC3.** Delece 11q22-23 zahrnuje geny *ATM* a často i *BIRC3* a vyskytuje se u téměř 10 % pacientů při diagnóze choroby, před zahájením iniciační terapie pak až u 20 %. Mutace reziduální alely *ATM* se vyskytuje až u 36 % pacientů a mutace *BIRC3* u dalších 5 % pacientů. Pacienti s delecí 11q mají

většinou pokročilé stádium choroby s nápadnou lymfadenomegalií, přítomnost UM-IGHV a interval do nutnosti zahájení terapie je obvykle kratší než u většiny ostatních podtypů CLL. Intenzivní imunochemoterapie (FCR) zlepšila prognózu těchto nemocných, ostatní léčebné režimy (BR, R-CLB) mají účinnost významně nižší. Medián OS při léčbě imunochemoterapií se pohybuje kolem 8 let, přítomnost mutace *ATM* a *BIRC3* OS dále snižují. BCRi a BCL2i mají u této skupiny nemocných velmi dobrou efektivitu, a jak dříve neléčení, tak i relabování pacienti s těmito genetickými změnami jsou kandidáty léčby zmíněnými molekulami.

- d. **Mutace genů NOTCH1 a SF3B1.** Gen *NOTCH1* bývá mutován až u 10 % nemocných s CLL v době diagnózy a jeho výskyt je často asociován s trizomií chromozomu 12. Imunochemoterapie s použitím rituximabu nezlepšuje prognózu nemocných s mutací *NOTCH1*, z části díky nižší expresi CD20 antigenu na povrchu buněk nádorového klonu (prediktivní význam), a tito nemocní jsou rovněž kandidáti inovativní cílené léčby. Navíc pacienti s touto mutací mají větší pravděpodobnost Richterovy transformace choroby, kde uvedenou změnu nacházíme až u 30 % případů. Mutace genu *SF3B1* se vyskytuje u 10 % neléčených pacientů s CLL a stejně jako u mutace *NOTCH1* se její výskyt významně zvyšuje u R/R pacientů. Přítomnost mutace *NOTCH1* či *SF3B1* je spojena s horší prognózou nemocných léčených imunochemoterapií, OS je srovnatelné s přežitím nemocných s delecí 11q, podání nových léků u TN i R/R nemocných může rovněž zlepšit jejich prognózu.
- e. **Komplexní změny karyotypu.** Tři a více genetických změn v jednom nádorovém klonu CLL charakterizuje komplexní karyotyp (KK), 5 a více změn pak vysoce rizikový KK. KK se vyskytuje u zhruba 10–15 % neléčených a až u 40 % R/R pacientů s CLL.

KK je často spojen s výskytem delecí 17p a 11q, mutacemi *TP53*, nemutovaným IGHV a ostatními rizikovými genetickými změnami a ve většině případů znamená vysoce nepříznivou prognózu při léčbě imunochemoterapií (prediktivní význam). Léčba BCRi a BCL2i může zlepšit prognózu nemocných s KK, výběr optimální terapie (jednotlivých léků a jejich kombinací) je u těchto pacientů v současnosti živě diskutován.

- f. **Mutace v dráze B-buněčného receptoru a mutace proteinů BCL2 rodiny.** Mutace v genech v dráze BCR, zejména mutace *BTK* na pozici C481S a *PLCG2*, jsou prediktorem rezistence k léčbě BCRi a vyskytují se i více než rok (9–15 měsíců) před selháním léčby. Stejně tak byly odhaleny mutace rodiny *BCL2* genů, které představují prediktor rezistence k léčbě BCL2i, i když rezistence k tomuto léku se jeví jako mnohem komplexnější proces. Rovněž se tyto mutace vyskytují velmi často před klinicky dokumentovanou ztrátou účinnosti léčby (v některých případech až 2 roky), a význam jejich časně detekce pro klinickou praxi je předmětem nynějšího výzkumu.

Závěrem lze konstatovat, že rozšiřující se paleta současných léčebných možností a důraz na výběr účinné, cílené a minimálně toxické léčby u konkrétního nemocného výrazně akcentují význam stanovení prediktivních a prognostických biomarkerů u pacientů s CLL.

#### Grantová podpora

Podpořeno grantem IGA-LF-2021-001 a MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).

#### Literatura

- Rossi D, Gerber B, Stüssi G. Predictive and prognostic biomarkers in the era of new targeted therapies for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2017;58:1548–1560.
- Ghamlouch H, Nguyen-Khac F, Bernard OA. Chronic lymphocytic leukaemia genomics and the precision medicine era. *Br J Haematol*. 2017;178:852–870.

3. Gaidano G, Rossi D. The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017;2017:329–337.
4. Yun X, Zhang Y, Wang X. Recent progress of prognostic biomarkers and risk scoring systems in chronic lymphocytic leukemia. *Biomark Res*. 2020;8:40.
5. Moia R, Patriarca A, Schipani M, et al. Precision medicine management of chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2020;12:642.
6. González-Gascón-Y-Marín I, Muñoz-Novas C, Rodríguez-Vicente AE, et al. From biomarkers to models in the changing landscape of chronic lymphocytic leukemia: evolve or become extinct. *Cancers* 2021;13:1782.
7. Lee J, Wang YL. Prognostic and predictive molecular biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn*. 2020;22:1114–1125.
8. Cohen JA, Bomben R, Pozzo F, et al. An updated perspective on current prognostic and predictive biomarkers in chronic lymphocytic leukemia in the context of chemoimmunotherapy and novel targeted therapy. *Cancers* 2020;12:894.
9. Hampel PJ, Parikh SA, Call TG. Incorporating molecular biomarkers into the continuum of care in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2021;62:1289–1301.

## Minimální reziduální nemoc u chronické lymfocytární leukémie

**Doubek M.**

*Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno*

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je onemocnění s různým klinickým průběhem. Diagnostika a léčba je individualizovaná – přihlíží se k věku, celkovému stavu, přidruženým chorobám a cílům léčby. V posledních letech přibyly zásadní poznatky týkající se posouzení prognózy i léčby. Zavedení cílených perorálních inhibitorů signálních drah (ibrutinib, idelalisib, akalabrutinib a venetoklax) představuje zásadní zlepšení výsledků léčby CLL [1].

Velice důležitým parametrem, kterým lze posuzovat účinnost terapie, je stanovení hladiny minimální reziduální nemoci (MRN) – snížení leukemického klonu pod úroveň detekce standardními metodami. Stále více nových léčebných kombinací (například venetoklax + obinutuzumab nebo venetoklax + rituximab) cílí na dosažení negativit MRN. Čím hlubší je léčebná odpověď, tím déle trvá doba do progresu nemoci a může se zlepšit i celkové přežití nemocných s CLL. Prognostický dopad MRN není závislý na podané léčbě či na jiných rizikových faktorech (mutační stav IGHV, molekulární a chromozomové aberace apod.) [1–3].

Vyšetření MRN v periferní krvi či kostní dřeni metodami s citlivostí mini-

málně 10–4 (pomocí 4–8barevné průtokové cytometrie, PCR s individuálně připravenými primery či pomocí NGS) je vhodné zvážit u nemocných po léčbě, která prokazatelně dosahuje negativit MRN (např. kombinované fludarabinové a bendamustinové režimy, kombinace založené na obinutuzumabu či venetoklaxu; alemtuzumab, alogenní transplantace). Dosud se nejedná o vyšetření povinné, ale význam analýz MRN v budoucnu pravděpodobně významně vzroste s tím, jak bude pomocí nových léčebných kombinací narůstat počet dosažených negativit MRN. Vhodné je především u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk [1,4,5].

Léčebnými režimy, které již jsou dostupné v běžné praxi a po nichž lze sledovat MRN jako parametr léčebné odpovědi, jsou především kombinace venetoklaxu s monoklonálními protilátkami. Při použití kombinace venetoklaxu s obinutuzumabem v první linii léčby CLL (studie CLL14) je dosahováno až 57 % negativit MRN v kostní dřeni a 76 % negativit MRN v periferní krvi [6]. V léčbě pacientů s relabovanou nebo refrakterní CLL lze použít kombinaci venetoklaxu s rituximabem (studie MU-

RANO). Touto kombinací lze dosáhnout až 62 % negativit MRN v periferní krvi [7]. Výhodou těchto léčebných režimů může být i časově omezená doba podávání, která snižuje riziko nežádoucích účinků, riziko poklesu lékové compliance a nebezpečí selekce rezistentního klonu.

Vzhledem k zavádění stále účinnějších léčebných protokolů CLL, představuje sledování MRN do budoucna výborný nástroj ke stanovení hloubky kompletní remise. Je zřejmé, že vymizení MRN po léčbě má silný pozitivní vliv na prognózu nemocných. Průkaz MRN při předchozí MRN negativitě navíc signalizuje riziko hematologického relapsu.

### Poděkování

Autor děkuje především svým spolupracovníkům z České skupiny pro chronickou lymfocytární leukémii (ČSCLL), s nimiž se podílí na řadě projektů, které se týkají i MRN u CLL, a vedou registr pacientů s CLL (CLLEAR), díky němuž je možné získávat data o léčbě CLL v běžné klinické praxi.

### Literatura

1. Smolej L, Špaček M, Pospíšilová Š et al. Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukémie 2021. *Transfúze a hematologie dnes*. 2021;24(3):91–106.
2. Bottcher S. Minimal residual disease quantification in chronic lymphocytic leukemia: clinical



significance and flow cytometric methods. *Methods Mol Biol.* 2019;1881:211–238.

3. Del Giudice I, Raponi S, Della Starza I, et al. Minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia: a new goal? *Front Oncol.* 2019;9:689.

4. Logan AC, Zhang B, Narasimhan B, et al. Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse

in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2013;27:1659–1665.

5. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia.* 2007;21:12–17.

6. Al-Sawaf O, Zhang C, Tandon M, et al. Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated

chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21:1188–1200.

7. Kater AP, Wu JQ, Kipps T, et al. Venetoclax plus rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia: 4-year results and evaluation of impact of genomic complexity and gene mutations from the MURANO phase III study. *J Clin Oncol.* 2020;38(34):4042–4054.

# MDS a preMDS: nový pohled na genetický podklad

Čermák J.

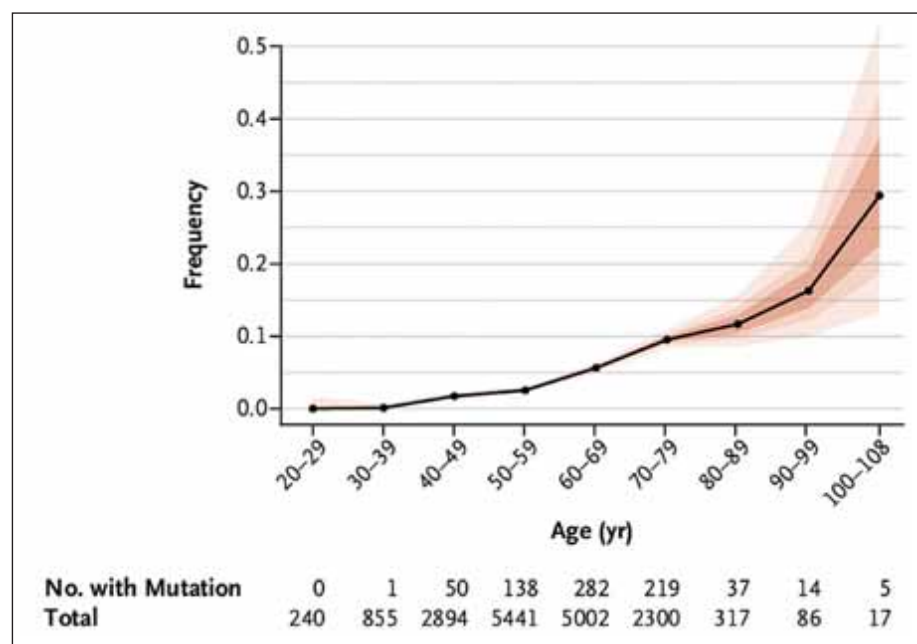
Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Hemopoetické kmenové buňky (HSC) mají schopnost sebeobnovy a diferenciaci do zralějších forem, s přibývajícím věkem se schopnosti a funkce HSC postupně mění. Ke stárnutí HSC významně přispívají zvýšená tvorba volných kyslíkových radikálů (ROS) a alterace odpovědi na poškození DNA spolu se změnami v hemopoetickém mikroprostředí. Nedostatečná odpověď HSC na poškození může vést ke vzniku genových mutací. Somatické mutace některého z genů byly popsány jen u 1 % zdravých jedinců mladších 40 let, ale u více než 10 % jedinců starších 65 let a jejich výskyt stoupá až k téměř 20 % u lidí starších 90 let (obr. 1). Řada těchto mutací se týká tzv. provozních genů a nemusí se během života projevit buď vůbec, či až po řadě let. Zásadní význam však mají mutace genů uplatňujících se v klíčových řídicích procesech funkce buňky (tzv. „driver mutations“).

Poškození germinálního genomu u vrozených selhání krvetvorby (IBMF)

může být spojeno s významným zvýšením incidence somatických mutací a s výskytem klonální proliferace již v časném věku (obr. 2). Pomocí NGS

byly prokázány mutace zárodečného genomu u 6–10 % nemocných s následným rozvojem selhání kostní dřeně a aplastickou anémií (AA) a u 14 % ne-



Obr. 1. Stoupající prevalence somatických mutací ve vztahu k věku.

## Obr. 2. Vrozená selhání krvetvorby a jejich riziko klonální proliferace.

onemocnění	postižené geny	poškozená funkce	incidence MDS/AML
dyskeratosis congenita / telomeroopatie	DKC1, TERT, TERC, TINF2, RTEL1, ACD/TPP1, PARN, NOLA2, NOLA3, CTC1, STN1, NAF1, NHP2, NOP10	porucha udržování délky a funkce telomér, genetická nestabilita	13 % ve 40 letech
Fanconiho anémie	FANC (A, CD1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, W), FANCB	porucha reparace, poškození DNA, tendence ke vzniku mutací	33 % ve 40 letech
deficit GATA2 (Embergerův syndrom, MonMac syndrom, DCML)	GATA2	regulace efektivní genové exprese, proliferace a diferenciacie HSC	6 % v 10 letech 39 % ve 20 letech 84 % ve 40 letech (!)
SDS (Schwachman-Diamondův syndrom)	SBDS	porucha funkce a diferenciacie ribozom a stabilizace mitózy	19 % ve 20 letech 36 % ve 30 letech
DBA (Diamond-Blackfanova anémie)	RPL 5, 9, 11, 11, 18, 26, 27, 31, 35, 35A, RPS10, 15A, 17, 19, 24, 26, 27, 28, 29, GATA1	porucha tvorby a stability ribozomů, deficit ribozomálních proteinů	2 % ve 45 letech
těžká kongenitální neutropenie	ELANE, GF11, HAX1, G6PC3, JAGN1	deficit tvorby elastázy neutrofilů nutné k aktivizaci G-CSF	22 % v 15 letech
familiární MDS spojený s trombocytopenií	ANKRD26, RUNX1, ETV6	porucha transkripce s dysmegakryopoezou a dysfunkčními trombocyty	40 % u mutace RUNX1 8 % u mutace ANKRD26 13 % u mutace ETV6

mocných s rozvojem MDS. Nejčastějšími molekulárními mechanizmy uplatňujícími se u IBMF jsou poruchy udržování délky telomér, reparace poškození DNA, biogeneze ribozomů, a kontroly proliferace. Produktem GATA-2 genu lokalizovaného na chromozomu 3 je tzv. „zinc-finger“ transkripční faktor regulující efektivní genovou expresi v hemopoetických buňkách a ovlivňuje proliferaci a diferenciaci hemopoetických kmenových buněk i lymfopoézu. Exprese GATA-2 genu je regulována epigenetickou modifikací a heterozygotní mutace GATA-2 vede k imunodeficitu a k predispozici k rozvoji myelodysplazie (MDS) se sklonem k následným (second hit) mutacím vedoucím ke klonální proliferaci již v dětském věku. U dětské refrakterní cytopenie (RCC) s monosomií 7. chromozomu byla přítomna mutace GATA-2 genu se ztrátou jeho funkce v 37 % případů, dospívajících s RCC a monosomií 7 byla mutace přítomna dokonce u 72 % nemocných, u 28 % nemocných byla přítomna též germinální mutace ASXL1. Kumulativní riziko vzniku MDS/AML je u mutace GATA-2 genu 6 % ve věku 10 let, 39 % ve věku 20 let a dokonce 81 % ve 40. roce věku. V posledních letech byly do určité míry objasněny změny na 7. chromozomu uplatňující se v patogenezi rozvoje MDS. Proteiny kódované SAM (steril alpha motif) domain-9 (SAMD9) a SAMD9 like (SAMD9L) geny lokalizovanými na 7. chromozomu se uplatňují v regulaci proliferace svým anti-proliferativním efektem, jejich germinální mutace je spojena se zvýšeným antiproliferativním účinkem s rozvojem pancytopenie. Důsledkem je zvýšená tendence ke vzniku somatických „kompenzačních“ mutací, které naopak indukují porušenou proliferaci. Výsledkem může být homologní rekombinace dlouhého raménka chromozomu 7 neutralizující snížení proliferace či vedoucí ke ztrátě efektu mutace SAMD9 a SAMD9L genů, nebo delece či ztráta mutované alely  $-7$ ,  $del(7q)$ ,  $der(1;7)$ .

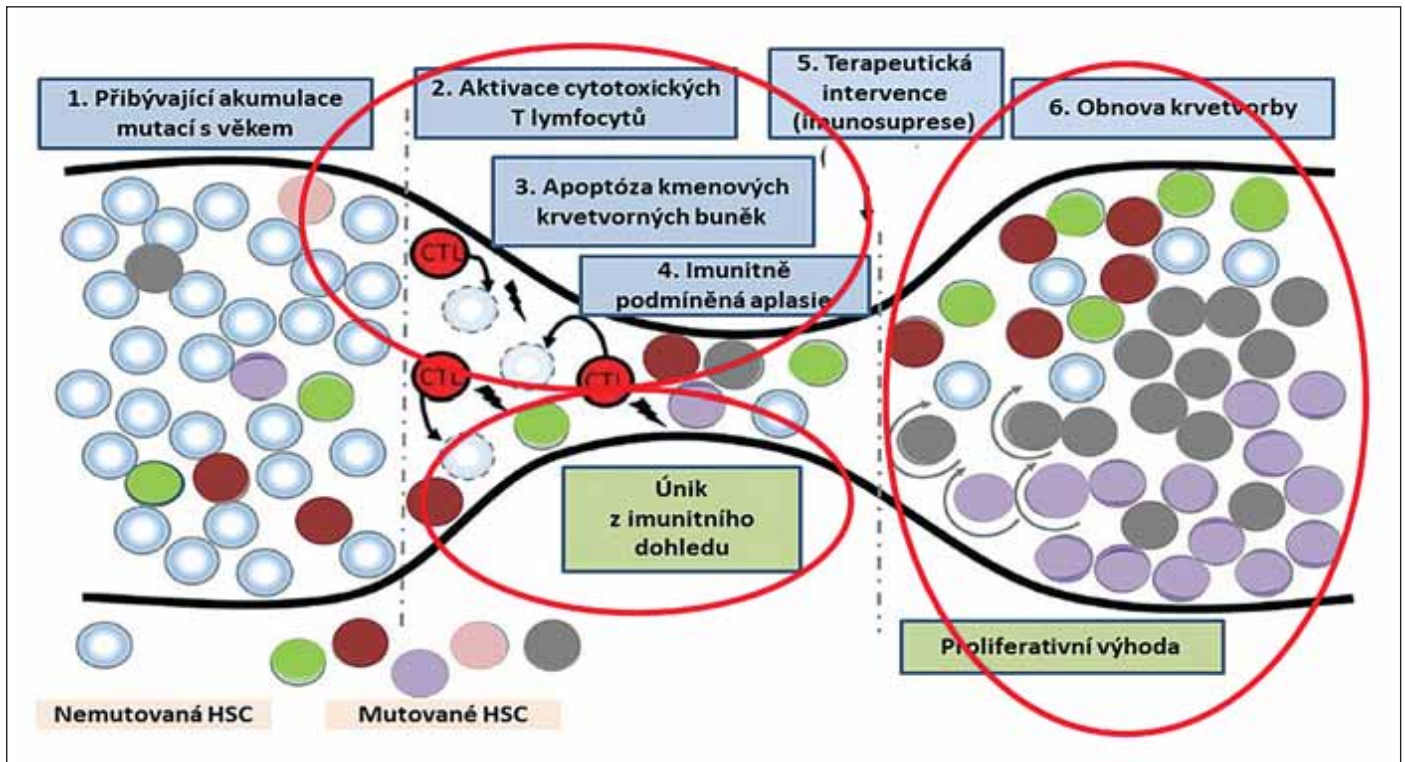
Obdobné riziko klonální proliferace je přítomno i u dalších vrozených se-

lhání krvetvorby (obr. 2). Fanconiho anémie (FA) vzniká v důsledku mutace genů FANC komplexu, jež se podílejí na opravě poškození DNA, u nemocných bývá přítomna progredující pancytopenie a zvýšené riziko maligního bujení, jež je 50× vyšší než v běžné populaci díky neschopnosti reparace poškození a perzistenci vznikajících mutací. U 18 % nemocných s FA byly prokázány germinální „driver mutace“ genů, zejména RUNX1. Kumulativní incidence vývoje do MDS/AML je u FA 33 % po 40. roce věku. Shwachman Diamondův syndrom (SDS) vzniká mutací SBDS genu nutného pro normální metabolismus RNA, funkci a vazbu ribozomálních podjednotek, rozvíjející se pancytopenie vede k rozvoji MDS, často s mnohočetnými aberacemi karyotypu, kumulativní riziko vzniku MDS/AML je u SDS 19 % ve 20. roce věku a 36 % v 30. roce věku. Diamond Blackfanův syndrom (DBA) vzniká mutací RPS či RPL genů, onemocnění je spojeno s poruchou biogeneze ribozomů, defektní translací a anemií. Zlepšení anemie a ústup závislosti na transfuzích může být způsoben postupným vývojem směrem do MDS, jenž jsme pozorovali i u jednoho z našich nemocných, kde byla současně vyšetřením NGS prokázána somatická mutace DNMT3A genu, incidence evoluce do AML je však poměrně nízká (2 % ve 45. roce věku), ke vzniku jiných malignit je cca 5 %. Další germinální mutace u nemocných s MDS byly pozorovány u RTEL1, TERT, TERC, TINF2 a dalších genů, kde se jedná o poruchy telomerické DNA nutné k funkci telomér a udržování integrity chromozomů (např. u dyskeratosis congenita). Těžká kongenitální neutropenie (SCN) je způsobena mutací ELANE genu zásadního pro aktivaci G-CSF. Nález mutace receptoru pro G-CSF (CS3R genu) vede k následné akvizici dalších mutací (nejčastěji RUNX1 genu). Riziko vývoje do MDS/AML je poměrně vysoké (22 % v 15. roce). Recentně byly popsány i germinální mutace dalších genů u nemocných se vznikem MDS před 60. rokem věku bez závislosti na přítom-

nosti IBMF (*MDH2*, *MSH6*, *ATR*, *MLH1*, *PMS2* geny).

U aplastické anemie byly prokázány germinální mutace u *DKC1*, *MPL*, and *TP53* genů (6–10 % nemocných). Somatické mutace byly nicméně prokázány u 47 % nemocných s AA, jejich výskyt stoupal s věkem, nejčastěji pozorované mutace byly mutace *DNMT3A* a *ASXL-1* spojena s proliferační aktivitou a postupným zvyšováním frekvence mutované alely (VAF), mutace *PIGA* genu a mutace *BCOR* a *BCOR-1* genů byly spojeny se stabilní či snižující se frekvencí mutované alely. Současná hypotéza předpokládá u AA malé procento buněk se somatickou mutací, u nichž může zejména díky imunopresivní léčbě postupně docházet ke zvyšování frekvence variantní alely a rozvoji klonální proliferace (obr. 3). V dalším vývoji AA po imunopresi směrem k MDS hraje důležitou roli akvizice nových „driver“ mutací, např. *RUNX1* genu.

Podstatou tzv. klonální proliferace neurčitěho významu (CHIP) je mutace genu s více než 2 % variantní alely, která postihuje geny související se vznikem nádorového bujení hematopoézy (*DNMT3A*, *TET2*, *JAK2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *TP53*, *CBL*, *GNB1*, *BCOR*, *UZAF1* a další), přitom není přítomno evidentní nádorové bujení a nález nesplňuje kritéria pro MDS, MGUS či PNH (obr. 4), nález CHIP je přítomen cca u 10 % nemocných starších 65 let, ale CHIP sama o sobě nepředstavuje vysoké riziko, pouze 0,5–1 % nemocných progreduje směrem k MDS či akutní leukémii (AL). CHIP je třeba odlišit od tzv. klonální hematopoézy spojené s věkem (*age-related clonal hematopoiesis* – ARCH), kde se stoupajícím věkem přibývá klonální proliferace genů s nízkou VAF, které nejsou spojeny s hematologickými chorobami. V poslední době je věnována velká pozornost mutovaným monocytům v rámci CHIP, tyto monocyty se diferencují do tkáňových makrofágů a indukují zánětlivý proces (např. v intimální tkáni arterií). Inflammasomy produkují interleukiny (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8*), jež podporují vznik aterosklerózy,



Obr. 3. Mechanizmy uplatňující se v rozvoji klonální proliferace z aplastické anémie.

#### Obr. 4. Klonální proliferace a její postupný vývoj.

jednotka	CHIP	ICUS	CCUS	MDS
genetické změny	mutace somatického genu, VAF > 2 %	žádné mutace či VAF < 2 %	mutace somatického genu či chromozomální alterace	somatické genetické alterace u vysokého % nemocných
cytopenie	nepřítomna	přítomna	přítomna	přítomna
dysplazie	žádná	žádná	žádná či < 10 % buněčné linie	> 10 % ve ≥ 1 buněčné linii
počet blastů	nezvýšen	nezvýšen	nezvýšen	může být zvýšen (< 20 % v kostní dřeni)
další kritéria	nepřítomnost hematologické malignity, MGUS či PNH	nepřítomnost hematologické malignity, MGUS či PNH	nepřítomnost hematologické malignity, MGUS či PNH	

ARCH – klonální proliferace většinou s mutacemi genů nikoli typických pro MDS (VAF < 2 %) u starších nemocných, u ICUS je třeba vždy vyloučit možnou vyvolávající příčinu mimo hematologickou malignitu

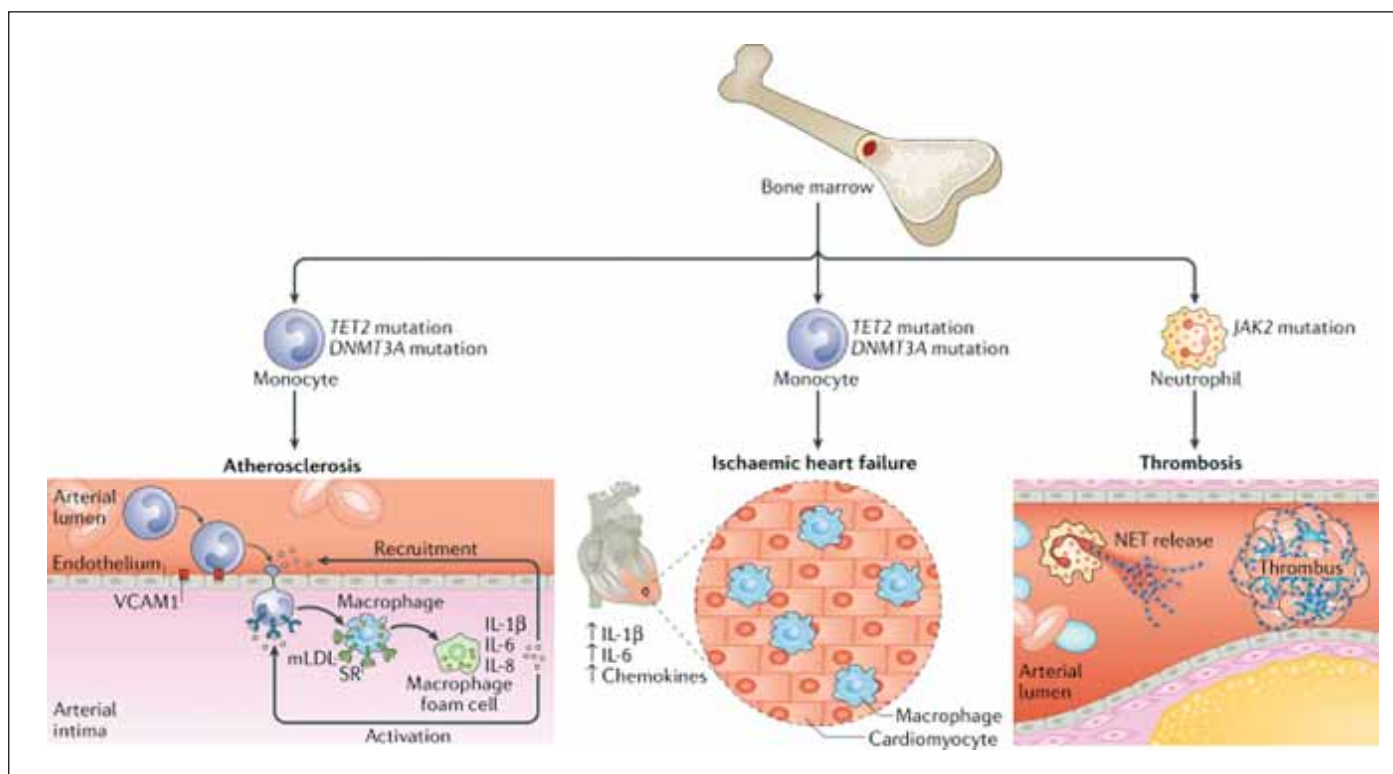
CHIP – klonální hemopoéza neurčitěho významu, ICUS – idiopatická cytopenie neurčitěho významu, CCUS – klonální cytopenie neurčitěho významu, ARCH – klonální hemopoéza ve vztahu k věku

remodelaci svaloviny myokardu a sekreci P-selectinu, jenž zpětně indukuje produkci makrofágů. CHIP tak může významně přispívat k poškození kardiovaskulárního systému (obr. 5).

Jako ICUS se označuje idiopatická cytopenie neurčitěho významu postihující jednu či více řad bez přítomnosti „driver mutace“ a bez jednoznačných morfologických známek potvrzujících dysplazii.


U ICUS je třeba vždy podrobné vyšetření k odhalení možné příčiny (chronické závažné či systémové onemocnění, onemocnění ledvin, možnost vývoje z vrozeného selhání krvetvorby). Samotné riziko ICUS není vysoké, je však nutné pečlivě sledování nemocných a kontroly nálezu v kostní dřeni pro včasný záchyt vzniku somatických „driver mutací“ a přechod do klonální cytope-

nie nejasného významu (CCUS). Bylo prokázáno, že během 5 let progreduje ICUS směrem k myeloidní malignitě cca v 10 %, kdežto CCUS v 75 %, někteří autoři považují CCUS za MDS bez morfologických známek dysplazie. Riziko progresu CCUS je největší tam, kde jsou přítomny vícečetné „driver mutace“ ve vysoké frekvenci variantní alely (VAF > 30 %)



**Obr. 5. Vliv CHIP na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. Monocyty nesoucí mutaci v rámci CHIP jsou schopny vycestovat do tkání (arteriální intima) a měnit se na mutované makrofágy, proces je doprovázen zánětlivou reakcí s uvolňováním cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 poškozujícími endotel, cytokiny vedou k remodelaci svaloviny myokardu, některé mutace (např. JAK-2) vedou k uvolňování sérových proteáz, jež indukují koagulaci a agregaci a napomáhají vzniku trombu.**

**Obr. 6. Rizikové skupiny mutací při rozvoji klonální proliferace.**

	<b>riziko progresse klonu</b>	<b>mutace</b>	<b>charakteristika</b>
 <b>AML</b>	poměrně malé	SF3B1	mutace sestříhového genu s prstěčitými sideroblasty, inefektivní erytropoézou a indolentním průběhem akvizice dalších mutací – významné zvýšení rizika
	zvýšené	DNMT3A, TET2, p53	indukce klonální proliferace, nejčastější mutace u CHIP – možnosti akvizice dalších mutací
	vysoké	ASXL1, SRSF2, EZH2, RUNX1, IDH1, IDH2, CBL, UZAF1, ZRSR2	progrese klonální proliferace (second hit mutation) nekontrolovaná proliferace, obecná porucha translace a energetický deficit buňky

V současné době je přítomna snaha o určité rozdělení somatických mutací způsobujících klonální proliferaci do skupin s odlišnou prognózou (obr. 6). Mutace sestříhového genu SF3B1 je nejčastější mutací u MDS, jež je přítomna spolu s mutací ostatních sestříhových genů u poloviny nemocných s MDS. Výsledkem mutace SF3B1 je porušená regulace PPOX a ABCB7 genů, jež vede ke snížení syntézy hemu a k poruše dodávky železa do mitochondrií. Izolovaná mutace SF3B1 je spojena s přítomností pr-

těných sideroblastů, inefektivní erytropoézou a indolentním průběhem. Tento vývoj je přítomen i u CHIP a CCUS s přítomností solitární mutace SF3B1. Příznivý prognostický význam mutace SF3B1 může být eliminován následnou akvizicí „driver mutací“ (DNMT3A, ASXL1, TET2, SRSF2, RUNX1, TP53), není však jasné, zda pro nepříznivý vliv stačí přítomnost dalších mutací, či je nutný současný nárůst počtu blastů v kostní dřeni.

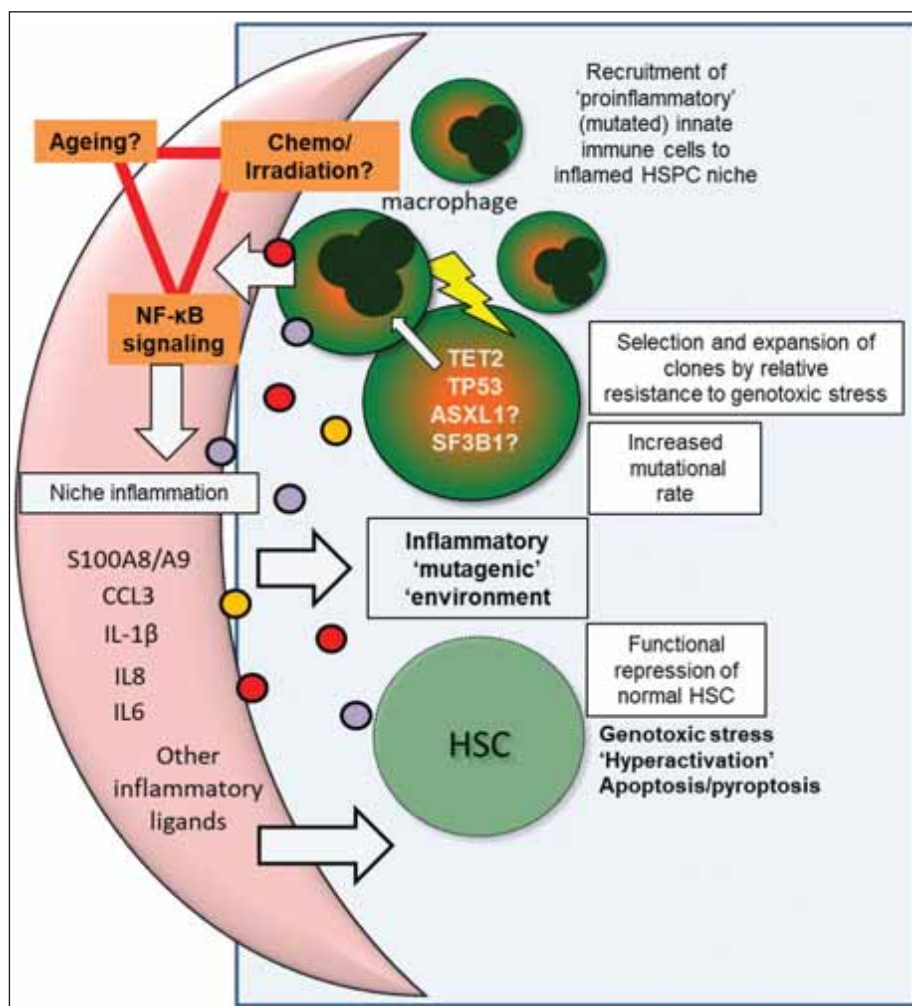
Ve druhé skupině jsou geny, jejichž mutace jsou nejčastěji podkladem CHIP.

Jedná se o geny uplatňující se v epigenetické modifikaci, TET2 gen je DNA metyltransferáza vedoucí k demethylaci DNA za přítomnosti  $\alpha$ -ketoglutarátu, naopak DNMT3A představuje metyltransferázu zprostředkující metylaci DNA. Gen p53 je tumor supresorický gen, jehož mutace vede k alteraci reakce na poškození buňky, indukci proliferace a genetické nestabilitě spojené s akvizicí dalších mutací. V současnosti bylo prokázáno, že nepříznivý efekt mutace p53 genu je odvislý od toho, zda je zachována ales-

poň 1 funkční alela genu či nikoli. Souhrnem možno říci, že se jedná o geny, jejichž mutace vedou k rozvoji genetické nestability a k předpokladu získání dalších mutací ovlivněním epigenetické regulace exprese genů.

Třetí skupinu tvoří již opakovaně zmíněné „driver mutace“, jejichž přítomnost signalizuje vysoké riziko progresu do MDS/AML bez ohledu na předchozí přítomnost CHIP či CCUS, ale představující často též další získané mutace u CHIP. ASXL1 je gen lokalizovaný v oblasti 20q11, jenž se uplatňuje v epigenetické regulaci histonů jejich posttranslační modifikací cestou polycomb represivního komplexu (PRC) a regulací Hox genu, výsledkem je inhibice proliferace, mutace ASXL1 vede ke kontinuální stimulaci proliferace. EZH2 gen kóduje methyltransferázu nutnou k efektu ASXL1 na proliferaci. RUNX1 je gen zprostředkující diferenciaci progenitorových hemopoetických buněk do zralých stádií, ovlivňující buněčný cyklus, biogenezi ribozomů a signální dráhy p53 a TGFβ. Jeho mutace vede ke ztrátě kontroly proliferace a zřejmě i k indukci přežití a proliferace mutovaných leukemických buněk. IDH1 gen hraje roli v tvorbě α-ketoglutarátu nutného k metylaci DNA a histonů, jeho mutace vedou k alteraci funkce TET2 genu, energetickému deficitu a k poruše inhibice tvorby volných kyslíkových radikálů. SRSF-2 je gen sestřihového mechanismu, jehož mutace ovlivňuje metabolismus a přežití RNA, stejně tak jako gen UZAF1. Jedná se tedy vesměs o geny, jejichž mutace vedou k hrubým změnám projevujícím se nekontrolovanou proliferací, obecnou poruchou transkripcí a energetickým deficitem buněk.

V současné době je rovněž velká pozornost věnována úloze hematopoetického mikroprostředí v kostní dřeni. V mezenchymálních buňkách hematopoetického mikroprostředí dochází k zánětlivé stimulaci, vyvolávajícími faktory mohou být stárnutí, poškození chemickými látkami či zářením či sekrecí zánětlivých mediátorů mutovanými buň-



**Obr. 7. Úloha hemopoetického mikroprostředí v rozvoji klonální proliferace. Různé faktory mohou vést k aktivaci tvorby zánětlivých mediátorů (vlevo), které vytvářejí zánětlivé mutagenní mikroprostředí. Dochází ke zvýšení genotoxického stresu, jenž poškozuje normální křetvorné buňky (HSC) a vede k jejich apoptóze, současně dochází k selekci mutovaných buněk rezistentních ke genotoxickému stresu, jejich klonální proliferaci a k tendenci akvizice nových mutací.**

kami imunitního systému (makrofágy). Vzniká lokální zánětlivé „mutagenní“ mikroprostředí ovlivňující progenitorové buňky. Dochází ke zvýšení genotoxického stresu, což negativně ovlivňuje proliferaci normálních kmenových buněk a vede k jejich apoptóze a k selekci mutovaných buněk rezistentních na genotoxický stres a indukujících tvorbu mutovaných imunitních buněk. Takto vznikají předpoklady pro klonální proliferaci a akvizici dalších mutací (obr. 7). Recentní nálezy též ukazují na vnitřní rezistenci mutovaných buněk na zánětlivé mediátory při rozvoji klonální proliferace.

Závěrem je možno shrnout, že všichni nemocní s cytopenií nejasného původu by měli být pečlivě vyšetřeni, mladší nemocní k vyloučení latentně probíhajícího vrozeného selhání křetvorbou s tendencí k rozvoji klonální proliferace, starší nemocní pak k odhalení CHIP a CCUS a možné akvizice dalších mutací, významně ovlivňujících progresi k MDS/AML.

#### Literatura

Genovese G, Kähler A, Handsaker R et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sample. *N Engl J Med.* 2014;371:2477–2487.

Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371:2488–2495.

Crisá E, Boggione P, Nicolosi M et al.: Genetic predisposition to myelodysplastic syndromes: a challenge for adult hematologists. *Int J Mol Sci*. 2021;22–31.

Keel SB, Scott A, HO PA. Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adults. *Haematologica*. 2016;101:1343–1135.

Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia. *N Engl J Med* 2015;373:35–47.

Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126:9–16.

Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Blood Adv* 2018;2–3404–3410.

Steensma DP. The Clinical Challenge of Idiopathic Cytopenias of Undetermined Signi-

ficance (ICUS) and Clonal Cytopenias of Undetermined Significance (CCUS). *Current Hematol Malig Rep*. 2019;14:236–542.

Malcovati L, Stevenson K, Papaemmanuil E et al. SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. *Blood*. 2020;136:157–170.

Raajmakers MH. The MDS Niche: Inflammation Driving Bone Marrow Failure and Clonal Evolution. *Educational Updates in Hematology Book*, 25th Congress of the EHA, 2020:161–165.

## Myelodysplastický syndrom v dětském věku

Suková M.

*Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha*

Myelodysplastický syndrom (MDS) je vzácné klonální onemocnění krvetvorby charakterizované inefektivní hematopézou a rizikem leukemické transformace. S incidencí 1–4 případy/milion tvoří cca 5 % hematologických malignit u dětí, což ve věkové skupině do 18 let představuje v ČR cca 5 případů ročně. MDS dětského věku zahrnuje heterogenní skupinu chorob, které jsou v kontextu revidované WHO klasifikace řazeny jak do kategorie Myelodysplastického syndromu, tak do kategorie Myelodysplastických/myeloproliferativních neoplázií (MDS/MPN) [1].

Primární MDS u dětí je velmi často spojen s hypoplázií kostní dřeně a cha-

rakterizován odlišným spektrem genových defektů a chromozomálních aberací ve srovnání s dospělými. Na jedné straně spektra dětského MDS je hypoplastická Refrakterní cytopenie dětského věku (RCC) s předpokladem progresu do selhání kostní dřeně, na druhé straně pokročilý MDS s excesem blastů (MDS-EB) nebo Juvenilní myelomonocytární leukémie (JMML). MDS v dětském věku často vzniká v terénu vrozeného selhání kostní dřeně (IBMF), což vysvětluje velkou diverzitu projevů. V současnosti je navíc identifikována řada geneticky podmíněných predispozic ke vzniku myeloidní neoplázie, které tvoří samostat-

nou kategorii specifickou pro dětský věk. Tab. 1. shrnuje základní rozdíly mezi MDS dětského a dospělého věku.

Klasifikace MDS dětského věku je proto založena nejen na morfologickém obrazu a cytogenetických nálezech (IPSS u dospělých), ale zohledňuje i další genetické faktory, které mají prognostický význam [2]. Prognóza MDS u dětí je ve srovnání s dospělými nepochybně příznivější, léčba je proto vedena s kurativním záměrem. Dominantní roli má alogenní transplantace krvetvorných buněk (HSCT), která je rutinně používána jako léčba první volby u pacientů s pokročilým nebo sekundárním („the-

**Tab. 1. Rozdíly mezi MDS dětského a dospělého věku [adaptováno podle 3].**

	Děti (0–18 let)	Dospělí > 40 let
Incidence/1 milion	1–4	> 40
Asociace s IBMFs a predisp. syndromy	> 30	< 5
Familiární výskyt	u části pacientů	nepřirozeně podobný
Chromozomální aberace (%)		
-7/7q-	25–30	10
-5/5q-	1	20
Molekulární aberace	<b>časté zárodečné mutace (GATA2), méně časté somatické, mutace v spliceosomu ne nebo výjimečně</b>	<b>zárodečné mutace neobvyklé, časté somatické, v spliceosomu běžné</b>
Léčebný záměr	kurativní	často paliativní

IBMFs – vrozená selhání kostní dřeně

rapy-related“) MDS a u RCC s genetickými abnormitami, kde dává více než poloviční šanci na dlouhodobé přežití. Využití imunosupresivní léčby (IST) a hypometylačních agens ve specifických situacích je léčebnou možností pro pacienty s absencí vhodného dárce pro transplantaci [3].

Pro stanovení prognózy a určení léčebné strategie u dětského MDS je v dnešní době zásadní cílená genetická diagnostika včetně využití metod sekvenování nové generace. Jednotný diagnostický i léčebný postup je koordinován na základě doporučení Evropské skupiny pro myelodysplastický syndrom u dětí (EWOG-MDS).

## BIOLOGIE MDS

Podstatou MDS je klonální proliferace vycházející z kmenové hematopoetické buňky, jejímž důsledkem je inefektivní krvetvorba s možnou progresí do selhání kostní dřeně a rizikem leukemické transformace. Biologické chování je dáno kombinací vrozených predispozičních faktorů a získaných genetických poruch, které se akumulují v průběhu nemoci. Typickou predispozicí v dětském věku představují zárodečné mutace v genech zasahujících do procesů DNA repair, stability telomer a ribozomů, transkripčních faktorů a liniové diferenciaci, která podmiňují vrozená selhání kostní dřeně a syndromy s predispozicí k myeloidní neoplázii. Expozice alkylačním látkám a inhibitorům topoizomerázy je známým podkladem sekundárního tzv. „therapy-related“ MDS po chemoterapii, který je charakterizován specifickými chromozomálními aberacemi a rychlou progresí. Ve srovnání s MDS dospělých je méně známo o genetických odchylkách v somatických liniích, které fungují jako spouštěče u primárního MDS. Podle recentních výzkumů se zdá, že geny běžně alterované u dospělých (TET2, DNMT3A, TP53, spliceosom komplex) nemají význam v patogeneze dětského MDS, kde se naopak jako drivery uplatňují somatické mutace SETBP1, ASXL1, RUNX1, a RAS onkogenů [4]. JMML je patogene-

Tab. 2. FAB klasifikace MDS dětského věku [adaptováno podle 1].

Typ	Zkratka	Kostní dřeň dysplazie 2 linií + % blastů	Periferní krev % blastů
Refrakterní cytopenie dětského věku	RCC	< 5 %	< 2 %
Refrakterní anémie s excesem blastů	RAEB	5–19 %	2–19 %
Refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci	RAEB-t	20–29 %	20–29 %

ticky jasně definována jako porucha signalizace způsobená mutacemi v RAS-MAPK signální dráze.

## DIAGNOSTIKA

Stanovení diagnózy MDS je stejně jako u dospělých založeno na histopatologickém obrazu kostní dřeně a cytogenetickém nálezu. Morfologicky je MDS charakterizován specifickou dysplázií alespoň ve dvou krvetvorných liniích (erytropoéza, myelopoéza, megakaryopoéza) a různým zastoupením blastů v kostní dřeni a periferní krvi, které zohledňuje stále používaná FAB klasifikace (tab. 2). Odlišná kategorizace dětského MDS zohledňuje většinou indolentnější průběh a pomalejší progresi nemoci ve srovnání s dospělými.

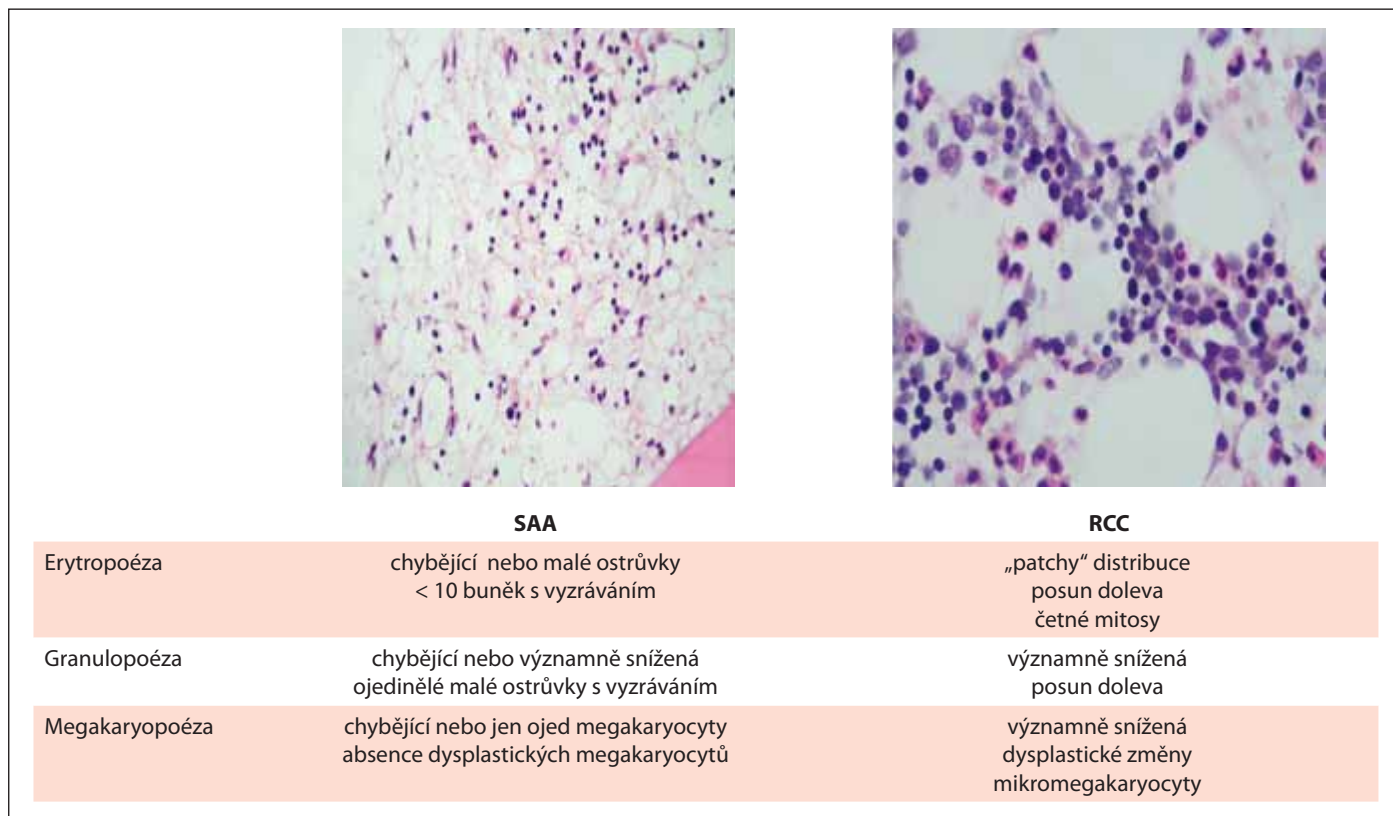
Častý obraz hypoplastické krvetvorby a postupný vývoj dysplázie se odráží v doporučeném diagnostickém postupu EWOG-MDS, který zahrnuje vyšetření kostní dřeně z více míst a opakovaně v odstupu 2–4 týdnů. Genetická diagnostika využívá jak metody cytogenetické, tak molekulární, včetně sekvenace panelů genů a celoexomového sekvenování. Cílem je detekovat vrozené poruchy krvetvorby a predispoziční syndromy, které vyžadují odlišný léčebný přístup.

## REFRAKTERNÍ CYTOPENIE DĚTSKÉHO VĚKU (RCC)

RCC je nejčastějším typem MDS u dětí (~70 %), nese specifické histopatologické rysy a je v naprosté většině případů spojena s hypocelulární kostní dřeni a absencí chromozomálních abnormit (70–80 %). Monozomie 7 je hlavním pro-

gnostickým faktorem pro progresi do pokročilého MDS (medián: < 2 roky), RCC bez chromozomálních abnormit může naopak zůstat dlouho stabilní bez potřeby léčebných zásahů. Jako unikátní jednotka byla RCC zařazena do WHO klasifikace v roce 2008. Morfologie (obr. 1) v kombinaci s periferní pancytopenií tvoří obraz selhání kostní dřeně, jehož příčinou v dětském věku může být také aplastická anémie (AA), vrozená selhání kostní dřeně, některé geneticky podmíněné syndromy (GATA2 deficiencie, SAMD9/9L), metabolické vady i stavy parainfekční, což představuje zásadní diferenciativně diagnostické dilema. Diskriminačním parametrem mezi RCC a aplastickou anémií je v rukách zkušeného patologa histopatologický obraz – nález dysplázie v hypoplastické dřeni a tzv. „RCC pattern“ (obr. 1). Odlišení vrozených selhání kostní dřeně, jmenovitě Fanconiho anémie, Shwachman-Diamond syndromu a Dyskeratosis congenita, je při absenci specifického fenotypu jen na morfologie obtížné, rutinně se proto provádí screening, v současnosti i panelovým testováním kandidátních genů. Přesto zůstává hypoplastický MDS bez chromozomálních abnormit obtížně definovatelnou jednotkou, která svým chováním odpovídá spíše nově zaváděnému pojmu „získané selhání kostní dřeně“, kam spadá i aplastická anémie. Předpokládanou společnou patogenezi s aplastickou anémií zohledňuje i léčebný algoritmus vypracovaný evropskou pracovní skupinou (EWOG-MDS) (schéma 1). Pro určitou skupinu pacientů s RCC je alternativou k alogenní HSCT imunosupresivní léčba (anti-





Obr. 1. Histopatologický obraz refrakterní cytopenie versus aplastická anémie.

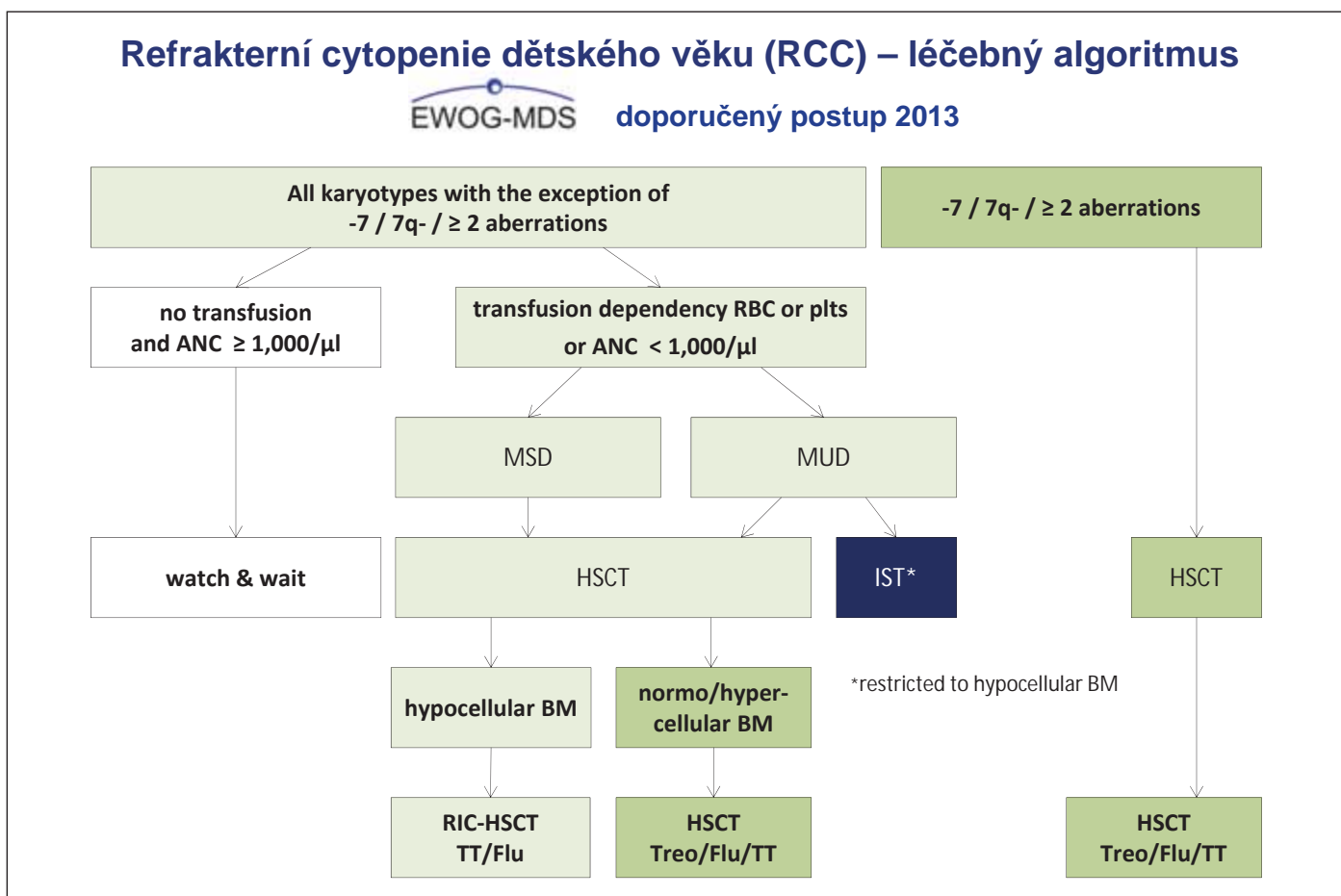


Schéma 1. Léčebný algoritmus u refrakterní cytopenie.

thymocytární globulin a cyklosporinA.). Zkušenosti s použitím režimu s redukovanou intenzitou (Fludarabine + Thotepa) v přípravě před HSCT vykazují srovnatelnou účinnost (EFS 75–80 %) a menší toxicitu ve srovnání s režimy myeloablativními [5].

### SYNDROMY S PREDISPOZICÍ K MYELOIDNÍ NEOPLÁZII (MN)

Tvoří samostatnou kategorii podle WHO klasifikace 2016. Jedná se o vzácná monogenní onemocnění s vysokou pravděpodobností vzniku MDS/AML, jejichž podkladem jsou zárodečné mutace v genech zasahujících do procesů DNA repair, stability telomer a ribozomů, transkripčních faktorů a liniové diferenciaci (tab. 3) MDS se manifestuje v časném dětském věku (< 4 roky), často je spojen s rekurentními aberacemi 7. chromozomu a syndromickými projevy. Onemocnění jsou většinou autozomálně dominantně dědičná, s variabilní penetrancí, je tedy možné dohledat familiární výskyt myeloidních malignit. Kromě klasických syndromů genomové instability (Fanconiho anémie, Morbus Down a Li-Fraumeni) sem patří vrozené syndromy selhání kostní dřene (IBMF) – Dyskeratosis congenita, Diamond-Blackfan anémie, Schwachman-Diamond syndrom, Kongenitální neutropenie), primární imunodeficiencie spojená s deficitem transkripčního faktoru GATA2, poruchy trombocytů s predispozicí k MN (mutace RUNX1, AMKRD26 a ETV6), predispozice k MN spojené s mutacemi CEBPA a DDX4 a tzv. „RAS-opatie“, vrozené syndromy spojené s myeloproliferací podmíněné zárodečnými mutacemi v signální dráze RAS [6]. Nález zárodečné mutace u dětského pacienta s MDS znamená iniciovat genetické vyšetření rodiny a z toho plynoucí genetické poradenství.

### MDS ASOCIOVANÝ S GATA2 DEFICITEM

GATA2 deficit je primární imunodeficit, geneticky podmíněný zárodečnou

**Tab. 3. Genetické syndromy s predispozicí k myeloidní neoplázii a riziko leukemické transformace [6].**

Onemocnění	Mutace (skupiny genů)	Frekvence MDS/AML
Fanconiho anémie (FA)	FANCA-W	30–40 %
Diamond-Blackfan anémie (DBA)	RPS, RPL (~22 genů)	5 %
Těžká vrozená neutropenie (SCN)	ELA2, HAX1, GFI1, JAGN1, G6PC3	30 %
Shwachman-Diamond syndrom (SDS)	SBDS, DNAJC2	30–40 %
Dyskeratosis congenita (DC)	DKC1, TERC, TERT, NOLA3, TINF2	5 %
Familiární trombocytopenie s dispozicí k AML (FPDPM)	RUNX1	~40 %
GATA2 deficiencie	GATA2	30–40 %
Trombocytopenie 5	ETV6	?
Trombocytopenie 2	ANKRD26	5 %
Li-Fraumeni sy	TP53	2–4% (+ MDR-AML)
MIRAGE sy, Ataxia-pancytopenia sy	SAMD9, SAMD9L	~20 %
DDX41 vázaná predispozice k AML	DDX41	? (starší)
Myeloidní neoplázie s mozaicismem +8	trizomie 8	?

MDR-AML – MDS spojený s předchozí chemo- radioterapií

mutací v transkripčním faktoru GATA2. Onemocnění původně popsané ve dvou fenotypech, jako MonoMAC syndrom (kombinace monocytopenie a náchylnosti s mykobakteriálním infekcím) a Embergerův syndrom, je dnes považováno za nejvýznamnější genetikou predispozici k MDS. Imunologicky je GATA2 deficit charakterizován monocytopenií, B a NK-lymfopenií v periferní krvi a lymfoidních tkáních, což definuje imunofenotypický obraz a umožňuje využít metod průtokové cytometrie ke screeningu. Manifestaci MDS ve 2.–3. deceniu, s mediánem ve věku 19,5 (12–35) let, může předcházet chronická cytopenie a vývoj hypoplastické krvetvorby, může se ale manifestovat i v časném věku jako familiární a rychle progresující pokročilý typ. Pro MDS spojený s GATA2 je typická asociace s aberacemi 7. chromozomu. V databázi EWOG-MDS byly zárodečné mutace v transkripčním faktoru GATA2 nalezeny u 7 % pacientů s primárním MDS < 18 let, u 37 % ve skupině s monozomií 7. [7] GATA2-MDS s aberací 7 je indikací k allogenní HSCT,

timing by měl zohlednit očekávané riziko rychlejší progresy do pokročilejších forem nemoci.

### MDS ASOCIOVANÝ S MUTACEMI SAMD9/9L

V současné době je velká pozornost věnována významu mutací genu SAMD9/SAMD9L (sterile  $\alpha$  motif domain-containing protein 9) a jejich vlivu na hematopoézu. Zárodečné mutace SAMD9/SAMD9L jsou podkladem vrozené endokrinopatie asociované s cytopenií a zvýšeným výskytem myeloidních malignit – syndromy Ataxia-pancytopenia a MIRAGE (myelodysplázie, infekce, porucha růstu, adrenální hypoplazie, abnormity genitálu a enteropatie). Ve zvýšené míře

jsou ale jak germimální, tak somatické mutace SAMD9/SAMD9L detekované i u primárních, nesyndromických MDS s monozomií 7 (20 % pacientů v databázi EWOG-MDS). Mechanizmy klonálního zvratu hematopoézy v přítomnosti mutací SAMD9/SAMD9L nejsou zatím zcela jasné (vliv monozomie 7, uniparentální

dizomie, další somatické mutace) a jsou předmětem současných výzkumů [8].

## POKROČILÝ MDS

Pod terminologický pojem pokročilý MDS (aMDS) definovaný biologickým chováním spadají jednak proliferativně se chovající MDS s excesem blastů (MDS-EB): RAEB a RAEB-t (tab. 2) a jednak MDS asociovaný s předchozí chemo- nebo radioterapií (MDR-AML). Ze 192 pacientů s pokročilým MDS registrovaných ve studii EWOG: MDS 2006 bylo 59 (30 %) hodnoceno jako sekundární MDS (po chemoterapii, po aplastické anémii nebo IBMF). Terminologicky na pomezí stojí také de novo Akutní myeloidní leukémie s nízkým počtem blastů (low-blast-count AML). Rozlišení mezi MDS a primární AML je dáno podle výskytu specifických rekurentních aberací, přítomnosti splenomegalie a vývoje počtu blastů. (doporučení EWOG-MDS). MDS je typicky asociován s aberacemi chromozomu 7 (monozomie nebo delece 7q u 30 % aMDS a 50 % MDR-AML) a chromozomu 5 (-5, 5q-), která je ale jako samostatná neobvyklá, bývá součástí komplexního karyotypu. Cytogenetické aberace u MDR-AML zahrnují kromě monozomie 7 a komplexního karyotypu i přestavby MLL genu. V nepřítomnosti monozomie 7 nebo rekurentních translokací spojených s AML je diagnóza aMDS konfuze a vyžaduje rychlé vyšetření exomu panelem zahrnujícím jak geny asociované s MDS/AML, tak s predispozičními syndromy, jmenovitě zasahující do signalizační RAS dráhy. Genetická charakteristika a dynamika progresu MDS jsou určujícím faktorem pro léčebnou strategii [2]. AML léčba ev. nízkodávkovaný cytosinarabinosid, případně kombinace s azacitidinem jsou varianty pro překlenutí období k transplantaci. Alogenní HSCT po myeloablativním přípravném režimu je jediná kurativní možnost. Ve skupině primárních pokročilých MDS je pak dlouhodobé přežití cca 60 %, přežití bez události 45 %. Ve skupině MDR-AML jsou výsledky stran dlouhodobého přežití navzdory setrvalému trendu

ke snižování TRM (úmrť v souvislosti s transplantací) neuspokojivé [9].

## JUVENILNÍ MYELOMONOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE (JMML)

JMML je samostatné klonální onemocnění krvetvorby, specifické pro časný dětský věk, nese určité rysy chronické myelomonocytární leukémie (CMML) dospělých. WHO klasifikace JMML zařazuje do skupiny myelodysplastických/myeloproliferativních neoplázií. Patogenetickým podkladem nemoci je konstitutivní aktivace RAS/MAPK signalizační dráhy podmíněná mutacemi v jednom z pěti genů: KRAS, NRAS, PTPN11, NF1 nebo CBL, které jsou prokazatelné u 90 % pacientů s JMML a definují jednotlivé subtypy. Somatické „gain-of-function“ mutace PTPN11, NRAS a KRAS jsou podkladem nesyndromické JMML, zatímco myeloproliferace na podkladě neurofibromatosis 1. typu (NF-1) a CBL syndromu je definována germinálně podloženou RAS-opatí a získanou bi-alelickou inaktivací specifických genů. Klinický průběh je variabilní, pro většinu pacientů je k dosažení dlouhodobého přežití nezbytná alogenní HSCT, nicméně u 15 % JMML (zejména s mutacemi CBL a NRAS) byla pozorována spontánní rezoluce klonu. Identifikace těchto pacientů je předmětem recentního výzkumu v rámci EWOG-MDS. Za tímto účelem jsou také zaváděny genomické metylační analýzy, které identifikují úroveň metylace onkogenů, a člení tak JMML podle biologického profilu do skupin nízké, střední a vysoké metylace. Metylační profil je prediktorem odpovědi na léčbu azacitidinem i pro přežití.

Hypometylační léčba azacitidinem se u JMML stala v posledních letech standardem. pravděpodobnost odpovědi závisí na mutovaném genu a metylačním stavu. U pacientů s vysokou metylací je malá šance na dlouhodobou odpověď, azacitidine je proto používán jen jako bridge k transplantaci. Alogenní HSCT zůstává jedinou kurativní možností u JMML, obecně má dlouho-

dobou úspěšnost ~50 % zejména pro vysoké (35 %) riziko relapsu. Relaps po transplantaci je opět ovlivnitelný azacitidinem [10].

## NOVÉ LÉČEBNÉ POSTUPY

MDS asociovaný s chromozomálními aberacemi nebo jinými genetickými poruchami je vyléčitelný pouze alogenní transplantací krvetvorných kmenových buněk (HSCT), proto většina (90 %) pacientů s MDS v určité fázi nemoci transplantaci podstoupí. Alternativní postupy jsou vyhrazeny pouze pro specifické podtypy (RCC), jako bridge k transplantaci (azacitidine u JMML) nebo jako modifikační léčba při relapsu nebo rezistentní nemoci.

Pro specifickou skupinu RCC s hypoplastickou kostní dřeví a absencí genetických abnormit je již dlouhou dobu alternativou k front-line HSCT od shodného příbuzného dárce imunopresivní léčba (IST) kombinující antithymocytární globulin, cyklosporin A a kortikoidy. Léčebné schéma i hodnocení odpovědi je stejné jako pro aplastickou anémii (Protokol EWOG-SAA 2010). Po ukončení dostupnosti koňského antithymocytárního globulinu jsou ale výsledky IST u získaného selhání krvetvorby neuspokojivé (dlouhodobá odpověď ~ 30 %), proto se indikace HSCT od nepřibuzného dárce dostává do první linie i u MDS s hypoplastickou kostní dřeví.

Diagnóza pokročilého MDS je urgentní situace, která vyžaduje provedení HSCT v nejbližším možném termínu. Úspěšnost transplantace u primárního MDS je 60 %, u sekundárního MDS po aplastické anémii 40 %, po solidních tumorech nedosahuje ani 20 %. Progrese nemoci může být i u dětí velmi rychlá, zejména v případě sekundárního MDS. Pak je nutné podání chemoterapie založené na cytosinarabinosidu a antracyklinech s cílem navození remise před transplantací. Úspěšnost chemoterapie je ale menší než u klasické AML s rekurentními translokacemi a přináší s sebou rizika zvýšené myelotoxicity a infekčních komplikací. Jako bridge k transplantaci

nebo záchranná pak přichází v úvahu experimentální léčba např. kombinující hypometylační agens (azacitidine) a bcl-2 inhibitor (venetoclax). Výsledky transplantací u sekundárního MDS po předchozí chemoterapii jsou přesto neuspokojivé, vyvolávají potřebu zavedení nových léků s účinností ověřenou ve farmakologických studiích, které jsou ale vzhledem k vzácnosti diagnózy obtížně realizovatelné.

Hypometylační agens azacitidine je v pediatrické praxi používán již více než 10 let. Prokázaná hypermetylace spektra genů účastnících se v klonální myelopoéze a zkušenosti ze studií u MDS dospělých byly podkladem pro off-label použití jako záchranné léčby u relabující JMML a refrakterního MDS. Nedávno ukončená prospektivní multicentrická evropská studie AZA-JMML-001 prokázala bezpečnost a účinnost azacitidinu i v léčbě nově diagnostikované JMML.

Ve skupině nízce metylovaných JMML, resp. spojených s NRAS nebo CBL mutací existuje možnost spontánního vymizení klonu. Jedním z recentních projektů EWOG-MDS je sledování přirozeného průběhu choroby s pomocí monitorace reziduální nemoci metodami sekvenace nové generace.

### Literatura

1. Hasle H, Niemeyer CM, Chessels JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and Myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 2003;17:277–282.
2. Hasle H, Niemeyer CM. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *Br J Haematol*. 2011;154(2):185–195.
3. Locatelli F, Strahm B.: How I treat Myelodysplastic Syndromes of Childhood: *Blood*. 2018;131(13):1406–1414.
4. Pastor V, Hirabayashi S, Karow A, et al. Mutational landscape in children with myelodysplastic syndromes is distinct from adults: specific somatic drivers and novel germline variants. *Leukemia*. 2017;31(3):759–762.

5. Strahm B, Locatelli F, Bader P, Niemeyer CM on behalf of the EWOG-MDS Study Group: Reduced intensity conditioning regimen in unrelated donor transplantation for refractory cytopenia in childhood. *Bone Marrow Transplantation* 2007;40:329–333.
6. Kennedy AL, Shimamura A. Genetic predisposition to MDS: clinical features and clonal evolution. *Blood*. 2019;133(10):1071–1085.
7. Wlodarski M, Hirabayashi S, Pastor V, Niemeyer CM. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood*. 2016;127:1387–1397.
8. Pastor VB, Sahoo SS, Niemeyer CM, Wlodarski M. Constitutional SAMD9L mutations cause familial myelodysplastic syndrome and transient monozomy 7. *Haematologica* 2018;130(3):427–437.
9. Yoshimi A, TruckenMuller W, De Moerloose B, et al. Hematopoietic stem cell transplantation with the busulfan, melphalan and cyclophosphamide regimen in children with therapy related myelodysplastic syndrome. *Bone marrow Transplantation* 2014;49(Supplement 1s:S383).
10. Niemeyer CM, Flotho C. Juvenile myelomonocytic leukemia: who's the driver at the wheel? *Blood* 2019;133(10):1060–1070.

## MDS s nízkým rizikem v době genetické diagnostiky

Červinek L.

Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno a MU

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu klonálních onemocnění kostní dřeně. Onemocnění můžeme definovat jako postižení kmenových buněk krvetvorby, charakterizované neúčelnou hemopoézou, vedoucí k cytopenii v periferní krvi a zvýšeným rizikem progresu do akutní myeloidní leukémie. Klinický obraz onemocnění je do značné míry variabilní, což je dáno heterogenitou onemocnění.

### DIAGNOSTIKA

Základním vyšetřením při diagnostice MDS je vyšetření kostní dřeně. Vzorok kostní dřeně jsou vyšetřovány morfolo- gicky, ale i cytogeneticky, imunofenotypi- začně a metodami molekulární genetiky. Cytogenetické vyšetření představuje

v současnosti základní metodu, přináše- jící zásadní diagnostické a prognostické informace. Chromozomální abnormality můžeme nalézt u 50–60 % pacientů s MDS, nejčastější zachycené změny jsou delece 5q, monosomie chromozomu 7, delece 7q, trisomie chromozomu 8 nebo delece 20q. Základní metodou je cyto- genetická analýza 20 buněk v metafázi, ale používaná je i metoda FISH (flou- rescenční *in situ* hybridizace) na nejdů- ležitější karyotypické změny například delece 5q či delece 7q. Důležité je i to, že mnoho pacientů má kombinaci cy- togenetických změn tvořící komplexní balancované či nebalancované translo- kace (komplexní karyotyp značí tři a více chromozomální abnormality). Stanovení karyotypických změn má zásadní vliv na

stanovení rizikovosti onemocnění pro konkrétního pacienta a zásadně ovliv- ňuje další léčebný postup. Další, ale zatím pouze fakultativní diagnostickou metodou je vyšetření metodou průto- kové cytometrie (flow cytometry). Při tomto vyšetření je možno blíže spe- cifikovat blastickou populaci či popu- laci dysplastických monocytů. V posled- ních letech byl učiněn zásadní pokrok molekulárně genetických vyšetřeních, jež umožnil přinést informace o zásad- ních změnách v kmenové buňce jež ná- sledně vyústí do klinického obrazu my- elodysplastického syndromu. Základní genetické aberace postihují genetické a epigenetické změny v transkripčních faktorech, změny v epigenetických mo- dulátorech, změny v oblasti miRNA

(mikro) a mikroprostředí kostní dřeně. Epigenetické změny zahrnují oblast DNA metylace. Oblasti hypermetylovaných CpG promotorů jsou terapeuticky ovlivnitelné podáním hypometylačních preparátů v rámci léčby pacientů s MDS. Další mutace z této skupiny jsou TET2, DNMT3a a IDH1/IDH2. Další skupina genů ovlivňující epigenetickou regulaci jsou modifikátory histonů. Do této skupiny genů řadíme EZH2, ASXL1. Další důležitou genetickou změnou je sestřih RNA, jehož alterace hraje zásadní úlohu u MDS. Do této skupiny řadíme geny SF3B1, U2AF1 a SRSF2. V rutinní praxi je již zavedeno vyšetření mutace tumor supresorického genu TP53, jež je nacházena především u pacientů s MDS s delecí dlouhých ramének 5 chromozomu či u pacientů s komplexními změnami karyotypu. Etiopatogeneze rozvoje změn typických pro MDS s delecí 5q souvisí s nálezem haploinsuficience genů pro ribozomální podjednotky RPS 14, která ovlivňuje erythropoézu. V souvislosti s klinickou manifestací trombocytózy a neutropenie jsou zásadní dva geny sloužící pro regulaci imunitního systému a to microRNA (miRNA)-145 a miRNA-146.

Haploinsuficience v oblasti miRNA-145 a miRNA-146 je dávana do souvislosti s rozvojem trombocytózy. Aktivace RPS14, miRNA-145 a miRNA-146 je jedním z předpokládaných efektů lenalidomidu na hematopoézu.

## LÉČEBNÉ MOŽNOSTI U MDS

Léčbu pacientů s MDS je nutné vždy přísně individualizovat v závislosti na potížích nemocného, na stadiu onemocnění, přidružených chorobách pacienta a na rizikovitosti onemocnění podle stanoveného IPSS-R. Celkově můžeme pacienty s MDS rozčlenit na skupinu s nízkým rizikem a na skupinu pacientů s vysokým rizikem. Všeobecně lze konstatovat, že u pacientů s nízkým rizikem se snažíme spíše ovlivnit symptomy onemocnění a u pacientů s vysokým rizikem přirozený vývoj onemocnění.

## PACIENTI S NÍZKÝM A STŘEDNÍM-1 RIZIKEM MDS (IPSS 0-1)

Observační strategie u pacientů s velmi nízkým rizikem vychází z dat z retrospektivních studií, jež prokázaly, že u pacientů s velmi nízkým rizikem starších 70 let s refrakterní anémií či MDS s del5q-nebylo očekávané přežití kratší ve srovnání s populací bez MDS. Dospělí pacienti s MDS nízkého rizika bez symptomatologické cytopenie, která nevyžaduje léčbu mohou být sledováni v pravidelných intervalech bez zahájení terapie.

## PODPŮRNÁ LÉČBA

Úkolem podpůrné léčby je především snížit nebo odstranit příznaky vyplývající z choroby, a zlepšit tak kvalitu života pacienta. Podpůrná léčba však chorobu nemůže definitivně vyléčit. Součástí podpůrné léčby jsou převody červených krvinek a destiček, protiinfekční a chelatační léčba a podávání růstových faktorů krvetvorby.

## RŮSTOVÉ FAKTORY KRVETVORBY

### Erythropoézu stimulující proteiny (erythropoetin)

Léčba růstovými faktory krvetvorby by měla být zvážena u pacientů s refrakterní symptomatologickou cytopenií. K léčbě anémie je možné použít rekombinantně vyrobený růstový faktor erytrocytů, erythropoetin (EPO) či darbopoetin. Léčba je účinná pouze u určité části nemocných. Je to především u těch pacientů, kteří mají nízkou hladinu svého vlastního EPO v krvi (méně jak 500 mU/ml) a mají transfuzní potřebu méně než 2 transfuzní jednotky za měsíc. Medián léčebné odpovědi na aplikaci erythropoetinu je cca 24 měsíců. Léčebná odpověď se může zvýšit, pokud nemocní dostanou EPO v kombinaci s růstovými faktory, které stimulují kostní dřeň k tvorbě bílých krvinek (G-CSF). Přidání G-CSF zvýšilo léčebnou odpověď na cca 50 % pacientů, a to u těch kteří byli rezistentní na monoterapii erythropoetinem. Pacienti s nízkým IPSS rizikem či s rizikem střední 1 a s symptomatologickou anémií, pokud

mají hladinu endogenního erythropoetinu pod 500 mU/ml a mají transfuzní potřebu méně jak 2 transfuzní jednotky za 1 měsíc jsou indikováni k léčbě podáním erythropoetinu v monoterapii či po 8 týdnech léčby ke kombinované léčbě erythropoetinem a G-CSF.

### Granulocyty stimulující faktor (filgrastim)

V případě, že má pacient nízký počet bílých krvinek a má infekční komplikaci, je v některých případech vhodné podání faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF), tzv. růstového faktoru bílých krvinek

### Imunomodulační terapie

Lenalidomid řadíme mezi imunomodulační preparáty u nichž byla v klinických studiích prokázána účinnost u pacientů s MDS nízkého rizika s přítomností delecí 5q. Působení preparátu spočívá v selektivní ovlivnění buněk s del 5q klonem inhibicí haploinsuficientních genů, jež jsou kódovány v deletovaném úseku 5 chromozomu (ovlivnění genů RPS14, miRNA-145 a miRNA-146). Léčba lenalidomidem se u MDS pacientů s izolovanou delecí 5q a transfuzní dependencí prokázala jako velmi účinná a vedla k dosažení transfuzní nezávislosti u 56 % pacientů. Preparát se podává v dávce 10 mg/den perorálně jako kapsle po 21 dnů v měsíci a po týdenní pauze se cyklus opět opakuje. Během této léčby se z nežádoucích projevů může objevit svědění kůže, vyrážka, zažívací potíže, únava a je zvýšené riziko trombózy. Zpravidla v prvním léčebném cyklu mohou být pozorovány výraznější poklesy parametrů krevního obrazu, které se od dalšího cyklu zpravidla upraví. Recentně publikovaná klinická studie prokázala účinnost podání lenalidomidu u pacientů s nízkým rizikem a transfuzní dependencí i bez přítomnosti delecí 5q.

Luspatercept je rekombinantní fúzní protein, který se váže na vybrané ligandy superodiny transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$  – TGF- $\beta$ ). Vazbou na specifické endogenní ligandy (např. GDF-11, akti-

vin B) Iuspatcept inhibuje signalizaci Smad 2/3, což vede k maturaci erytroidních buněk prostřednictvím diferenciaci erytroidních prekurzorů v kostní dřeni. Signalizace Smad 2/3 je abnormálně vysoká v modelech onemocnění charakterizovaných neúčinnou erytropoézou, tj. MDS a  $\beta$ -talasemie MDS. Indikace léčby transfuzně dependentní LR MDS RARS, RARS-T s mutací SF3B1.

## ALOGENNÍ TRANSPLANTACE

U pacientů s MDS nízkého a středního-1 rizika není alogenní transplantace krvetvorných buněk standardně indikována. Její zvažování je pro mladší nemocné (do 60–65 let) s těžkou a zhoršující se cytopenií, výrazně sníženou buněčností kostní dřeni (hypoplazií) nebo přítomností vazivových vláken (fibró-

zou) ve dřeni. Provedení transplantace by se mělo rovněž zvažovat u sekundární formy MDS po předchozí léčbě chemoterapií či radioterapií, protože se jedná prognosticky o nepříznivou formu MDS. U pacientů se středním –1 rizikem je alogenní transplantace indikována v přítomnosti více jak 5 % blastů v kostní dřeni nebo při průkazu nepříznivého karyotypu.

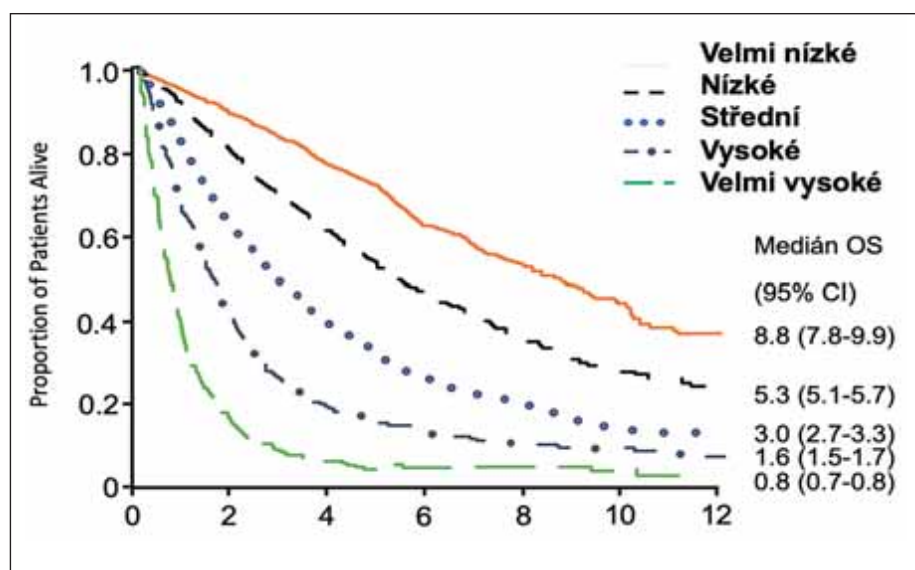
## Léčba netransplantovaných nemocných s MDS s vysokým rizikem a nemocných selhávajících na léčbě azacitidinem

Jonášová A.

1. Interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Myelodysplastický syndrom je heterogenní skupina klonálních chorob hemopoetické kmenové buňky charakterizovaných inefektivní krvetvorbou, periferní cytopenií, morfologickou dysplazií a nebezpečím transformace do akutní myeloidní leukémie (AML). I přes stálý intenzivní výzkum je MDS jednou z nejobtížněji řešitelných hematologických malignit.

S ohledem k volbě terapie nemocné s MDS dělíme na nižší a vyšší rizikové skupiny, pomáhá nám při tom skórovací systém IPSS (*international prognostic scoring system*), nověji revidovaný (IPSS-R), který kombinuje více faktorů. Graf 1 ukazuje, jak rozdílné je přežívání nemocných v jednotlivých kategoriích IPSS-R. Riziko je dnes hodnoceno i podle přítomnosti některých mutací. Právě s přílivem výsledků molekulární genetiky, se sekvenováním nové generace a s identifikací souboru prognosticky méně či více významných mutací je vzrůstající snaha implementovat mutační stav do skórovacích systémů a algoritmů terapie. Nicméně vzhledem k mnohým dalším faktorům jako je velká různorodost mutací u MDS, jejich variabilní kombinace, vliv variantní alelické frekvence, je imple-



Graf 1. Kaplan-Meier křivky mediánů OS u nemocných v jednotlivých kategoriích IPSS-R systému.

mentace mutačního stavu do prognostického systému ještě nedeřešená. Jak ale ukážeme v dalším textu, je existence určitých mutací již využívaná k cílené terapii u MDS nemocných.

Cíle terapie vysoce rizikových nemocných jsou: eliminace patologického klonu to jest snaha o eradikaci onemocnění u mladších nemocných, kteří nejsou intenzivní terapii, dále nám pak vždy u všech nemocných jde o prodlou-

žení celkového přežívání (*overall survival* – OS), prevenci a posun doby do AML transformace a samozřejmě obdobně jako u nízké rizikových nemocných zlepšení cytopenií a kvality života. Základní přístupy při současných možnostech terapie nemocných s vysokým rizikem MDS ukazuje schéma 1.

Intenzivní terapie, která jediná zatím vede k trvalému vyléčení, je stále představovaná pouze alogenní transplantací.

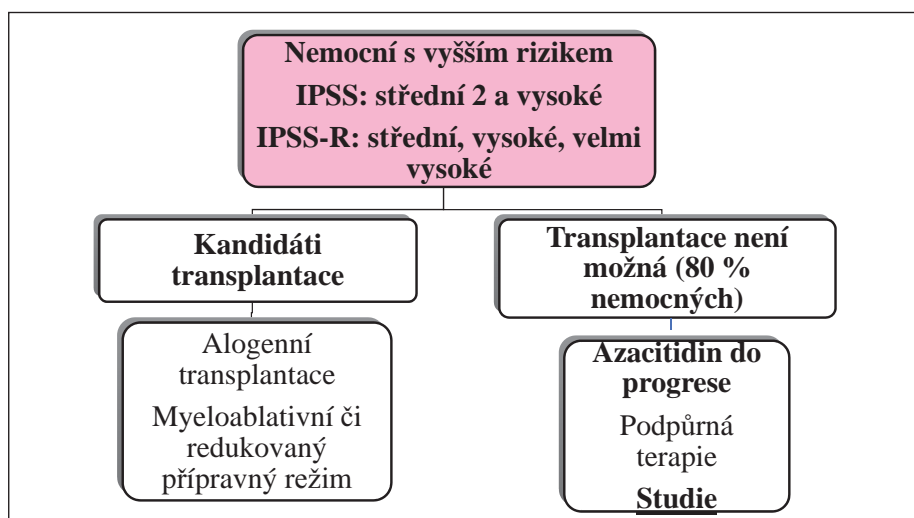
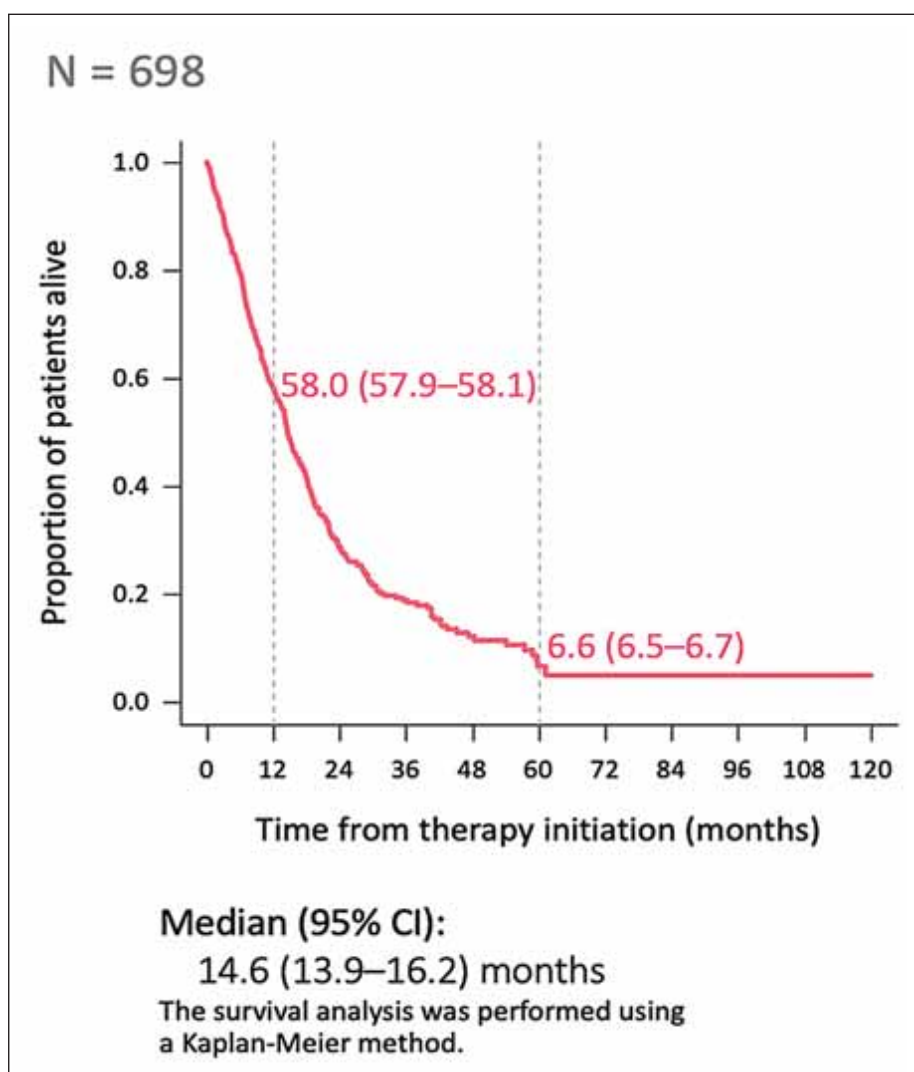


Schéma 1. Základní postupy léčby nemocných s MDS s vyšším rizikem.



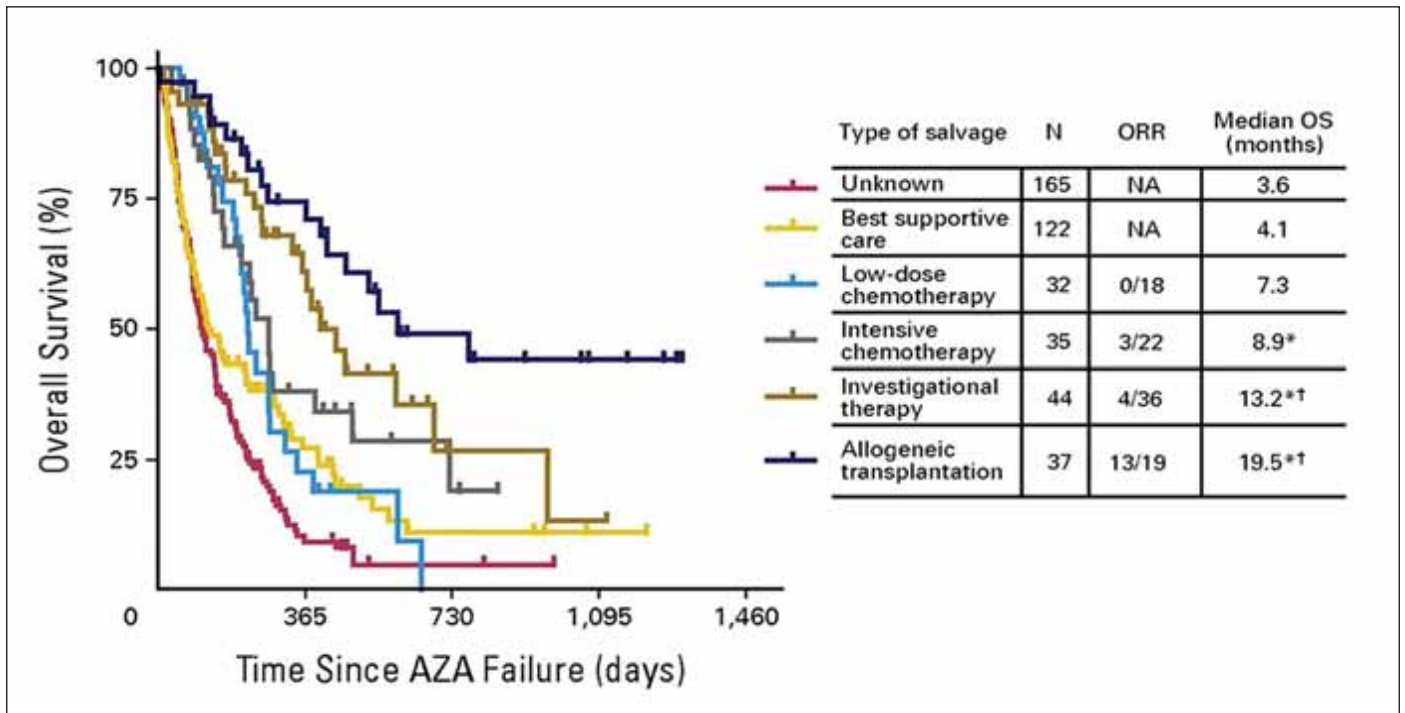
Graf 2. Kaplan-Meier křivka přežívání nemocných léčených azacitidinem v ČR (data z poslední analýzy MYDYS registru (Český MDS registr)).

Vzhledem k mediánu věku MDS nemocných, který se pohybuje kolem 70 let, a četným přidruženým komorbiditám

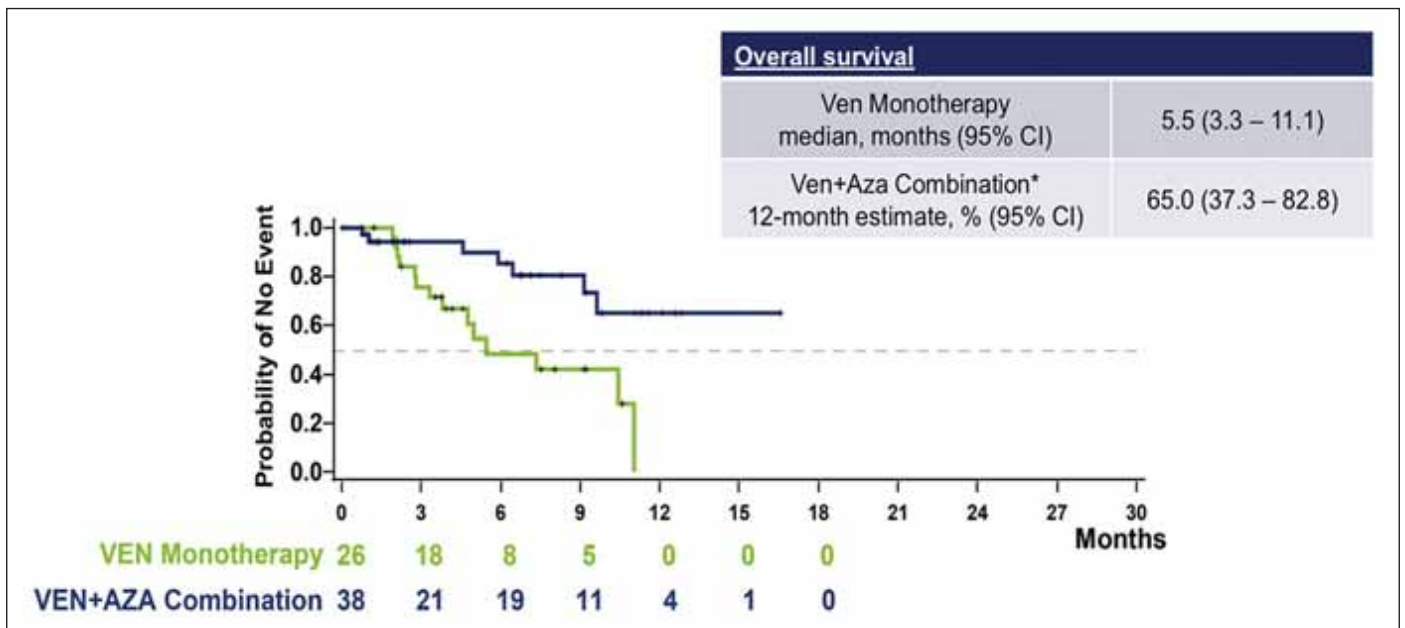
u starších pacientů, je kandidátů vhodných k transplantaci reálně jen malé procento. Přínosem je zde používání

přípravných režimů s redukováným přípravným režimem s nižší toxicitou pro starší nemocné. Jak správně připravit nemocné k transplantaci je stále otázkou. Zdá se – a je též vždy naší snahou – že nemocní s menším počtem blastů před samotnou transplantací mají lepší výsledky. V tomto případě se jeví jako výhodné použití azacitidinu, který je méně toxický než intenzivní chemoterapie a nemocní vstupují k samotné transplantaci v lepším stavu. To a jaké terapie a režimy použít k prevenci a snížení počtu relapsů, které jsou relativně vysoké u transplantací s redukováným režimem, je stále předmětem četných studií a tvoří samostatné téma.

Jak ukazují mnohé výsledky recentních studií, v terapii vysoce rizikových nemocných dosud není překonán již výše zmíněný azacitidin. Tvoří základ terapie na jedné straně s již potvrzeným benefitem delšího přežívání proti standardním terapiím představovaným nízké dávkovanou nebo i intenzivní terapií jako u AML, na druhé straně je jasné, že v monoterapii většinou nevede k eradikaci onemocnění, dlouhodobým kompletním remisím či opravdu dlouhodobým odpovědím. Naše první i poslední analýza provedená v rámci spolupráce České MDS skupiny, podobně jako naše poslední data 628 nemocných s mediánem OS 14,6 měsíců, ukazuje velmi dobře, jak je MDS s vyšším rizikem stále problematické terapeuticky a jak nezbytné je zlepšení výsledků monoterapie azacitidinem (graf 2) [1]. Ještě větším problémem je terapie po selhání azacitidinu v mnohých analýzách se délka přežívání pohybuje mezi 4–5 měsíců (graf 3). Tab. 1. velmi dobře ukazuje, jaké jsou současné možnosti léčby v běžné praxi a jím odpovídající přežívání nemocných [2]. Dosud nebyla stanovena žádná specifická doporučení, jak přistupovat k nemocným, kteří selžou na terapii primárními demethylačními preparáty (azacitidin, decitabin), ať již jde o refrakterní nebo relabované (R/R) MDS nemocné. Je nutné vždy individuálně hodnotit stav nemocného, náš cíl a možnosti. Primární a sekundární



Graf 3 + Tab. 1. Křivky přežívání jednotlivých terapií po selhání azacitidinu + jednotlivé typy terapie, ORR a OS [2].



Graf 4. Kaplan Meier křivky přežívání MDS nemocných R/R [7].

rezistence na azacitidin je proto velkou výzvou v budoucnosti léčby MDS s vyšším rizikem. Jedním z jednodušších postupů, jak zabránit vzniku primární rezistence, je dodržovat pravidla terapie (správné dávky a intervaly mezi léčbou). Obecně se po letitých zkušenostech domníváme, že správné dávky jsou nezbytné v zahájení léčby, ale v udržení odpovědi je nutná pravidelnost a udr-

žování správných intervalů mezi cykly – ne více než 5 týdnů. Je tak znemožněno narušení křehké rovnováhy mezi kontrolou patologického klonu, který v nemocném pravděpodobně stále přežívá, a jeho schopností vytvořit si na léčbu rezistenci. I u dlouhodobě odpovídajícího nemocného může terapie takto náhle selhat. Prvním pokusem, jak se vypořádat s R/R onemocněním, byla záměna za

jiný demetylačním preparát. Jako první se nabízel decitabin. Nicméně protože tento postup celkově nevedl k podstatným trvalejším efektům, obrátila se pozornost k novým demetylačním preparátům. Nadějným se zdál **guadecitabin**, analog decitabinu s prodlouženým efektem a možnou podkožní aplikací. Ve studii fáze I/II ze 105 nemocných (51 neléčených a 54 R/R) bylo dosaženo celkové



odpovědi (*overall response rate* – ORR) ve 40 % a 55 % [3]. Nicméně v další studii fáze II bylo dosaženo odpovědi pouze u 14 % a medián OS byl 7 měsíců [4]. Navíc se z dosud nepublikovaných zdrojů zdá, že ani randomizovaná studie fáze III, která probíhala i v ČR a kde byl guadecitabin testován proti výběru investigátora, nedosáhla lepších výsledků. Nadějnějším preparátem z demetylačních látek by mohl být **ASTX727**. Jde o perorální preparát – analog decitabinu kombinovaný s inhibítorem citidinu deaminázy cedazuridinem. Předběžné výsledky fáze II 50 nemocných, z nichž 96 % byli R/R MDS nebo CMML, bylo dosaženo ORR u 62 % s 8 (16 %) CR, 14 (28 %) CRm (marrow CR) a 9 (18 %) hematologického zlepšení (*hematology improvement* – HI) [5].

Nicméně budoucností terapie jak u primoléčby, tak u R/R nemocných vedoucí k prodloužení přežívání a zvýšení procenta odpovědi bude nejspíše kombinační terapie. Zatím u všech nových typů stále tvoří základ ke kombinacím azacitidinu. Jmenujeme nové perspektivními preparáty použité zatím pouze v klinických studiích v kombinacích prakticky vždy s azacitidinem, a to jak u primoterapie, tak u R/R. Sem patří intenzivně citovaná kombinace azacitidinu s BCL-2 inhibítorem **venetoclaxem**, který je již v USA povolen v terapii AML u nemocných, kteří nejsou kandidáty intenzivní terapie. Zatím u MDS máme data pouze z výsledků fází 1 a 2. Za všechny uvádíme nejnovější studii 57 léčených MDS nemocných s vysokým rizikem s použitím této kombinace v primoterapii (NCT02942290) [6]. Celková odpověď (ORR) byla 77 % se 45 % CR. Medián OS nebyl dosažen (graf 4). Na posledním ASH (American Society of Hematology) meetingu 2020 bylo prezentováno několik dalších studií této kombinace u R/R onemocnění. Uvádíme studii fáze Ib Zeidan et al. s 46 R/R – MDS nemocnými, u nichž bylo dosaženo kombinací azacitidinu s venetoclaxem 50 % ORR s 13 % CR a 38 % CRm, z nichž 44 % dosáhlo hematologického zlepšení [7].

Naproti tomu monoterapie venetoclaxem vedla jen k 7 % ORR, což je skutečností i u dalších nových preparátů – malá efektivita v monoterapii.

S identifikací specifických mutací u nemocných s MDS se rozvíjí též možnost terapeutického využití inhibitorů těchto mutací. Jde o skutečně cílenou terapii. Sem patří kombinace azacitidinu s inhibitory IDH 1,2 (isocitrát dehydrogenáza) (**IDH1 inhibitor – ivosidenib, IDH2 inhibitor – enasidenib**). Z dosud raných fází menších klinických studií u MDS jsou pozoruhodné průběžné výsledky studie fáze 2 (NCT03383575). Jde o terapii enasidenibem v kombinaci s azacitidinem u nemocných s *IDH2* mutací jak v primoléčbě, tak u R/R nemocných na azacitidinu. Ve studii bylo dosaženo 85 % ORR, 77 % CR + CRm u azacitidin-naivních nemocných a 56 % ORR s 39 % CR + CRm [8]. Zajímavé jsou též výsledky inovativní terapie s použitím **APR-246 (Eprenetapopt)**. Jde o první malou molekulu, která se kovalentně váže na protein p53, vede k stabilizaci tohoto proteinu, zástavě buněčného cyklu a následně apoptóze buňky. Tento preparát selektivně indukuje apoptózu buněk s mutací TP53. Ve studii fáze 1 b/2 se zařazením 51 nemocných bylo dosaženo 71 % ORR s 44 % CR. U MDS nemocných s izolovanou mutací TP53 bylo dosaženo 50 % CR s 38 % kompletní molekulární odpovědi s VAF pod 5% a významným prodloužením OS u respondentů (14,6 vs. 7,5 měsíců;  $p = 0,0005$ ) [9]. V současné době probíhá v USA fáze 3 randomizované studie s APR-246 v kombinaci s azacitidinem proti samotnému azacitidinu (NCT03745716).

Zajímavé jsou též výsledky studie fáze 1b používající kombinaci azacitidinu s **magrolimabem** (dříve 5F9), protilátkou proti CD47 (makrofágový „*immune checkpoint*“). Blokáda CD47 indukuje fagocytózu leukemických kmenových buněk v AML modelech. Do studie bylo zařazeno 68 nemocných (39 s MDS s vyšším rizikem, 29 AML). ORR byl 91 % u 33 hodnotitelných azacitidin-naivních MDS nemocných se 42 % CR a 24 % CRm [10].

Dosaženo bylo vysoké procento CR (75 %) u nemocných s mutací TP 53. Co se týče R/R nemocných ale zatím nejsou k dispozici žádná data, a to jak u magrolimabu, tak u eprenetapoptu.

Perspektivní kombinací pravděpodobně bude též kombinace azacitidinu s perorálním **rigosertibem**, multikinázovým inhibítorem (inhibice PLK a PI3K kináz). Rigosertib v infuzním podávání v monoterapii byl testován ve studii u R/R MDS, nicméně studie byla přerušena pro neuspokojivé výsledky průběžné analýzy, kdy nebyl efekt zvláště v prodloužení OS proti standardní terapii. Do nitrobuněčných procesů též zasahuje další látka, a to inhibitor ubiquitinace **pevonedistat**, který inhibuje NEDD8-aktivací cullin-závislé ubikvitin ligázy. Inhibice NAE pomocí pevonedistatu interferuje s ubikvitinací a degradací určitých proteinů v proteozomu, což při jejich akumulaci nakonec vede k buněčné smrti. Výsledky studie fáze 2 u MDS (pevonedistat v kombinaci s azacitidinem) byly publikovány letos v Leukemia [11]. Ve skupině nemocných s MDS s vysokým rizikem bylo dosaženo v rameni pevonedistat + azacitidin významných rozdílů proti rameni monoterapie s azacitidinem (OS: 23,9 vs. 19,1 měsíců, CR: 51,7 vs. 26,7 %). Ještě nadějnější byly výsledky ve skupině AML do 30 % blastů ve dřeni, kde byl rozdíl OS (23 vs. 16 měsíců). V současné době i v ČR probíhá fáze 3 klinického hodnocení. Výsledky u R/R nemocných jsou zatím omezené na jednu studii prezentovanou na AHS 2019 (NCT03238248) [13]. U 21 hodnotitelných nemocných byl ORR 42 % s 23,8 % (CR a CRm), medián trvání odpovědi byl 8,7 měsíců. Stabilizaci onemocnění dosáhlo 38 % nemocných.

Nutné je též zmínit imunitní protinádorovou terapii. Na rozdíl od terapie solidních nádorů a v hematologii Hodgkinova lymfomu v terapii MDS nepřinesly závěry raných fází studií s nivolumabem, ipilimumabem a zatím i pembrolizumabem významně nadějnější výsledky. Nadějnější může být nová generace těchto

látek. V ČR v současné době probíhají studie fáze 2 a 3 používající kombinaci azacitidinu a MBG453 (sabatolimab), což je monoklonální anti-TIM-3 protilátka (NCT03946670, NCT04266301). TIM-3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-3) (TIM-3) je receptor s inhibičním efektem, hrající roli v získané a primární imunitě. Je silně exprimován na povrchu leukemických buněk a MDS blastů. Blokáda tohoto receptoru může vést k obnově protinádorové imunity. Předběžná data fáze 1 zatím ukazují jeho velmi dobrou snášenlivost a minimální toxicitu a efektivitu u nemocných s MDS. Z 35 hodnotitelných nemocných ORR byl 62,9 %, 8 % CR a 8 % CRm. Opět u R/R nemocných zatím nejsou žádná data. V neposlední řadě je třeba zmínit velmi optimistické výsledky průběžné analýzy naší akademické, otevřené randomizované studie AZA-G (kombinace **azacitidin s G-CSF** –granulocyte colony stimulating factor oproti azacitidinu v monoterapii). Studie vychází z našich preklinických dat, která ukazují synergický efekt azacitidinu a G-CSF na diferenciaci myeloidní řady (39). Tato studie, která probíhá na I. Interní klinice ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze, dokládá efektivitu předléčení G-CSF vyšším ORR (77 %), CR (48 %) a delším OS u nemocných léčených kombinací terapií (medián OS: 18 proti 14 měsícům). Velkou výhodou této studie je okamžité klinické využití této kombinace, neboť oba léky jsou k dispozici v běžné praxi. Finální analýza 80 léčených nemocných se nyní připravuje k publikaci.

Otázkou u nemocných s MDS a zvláště R/R nemocných je použití protinádorové klasické chemoterapie. Shoda již panuje v tom, že intenzivní chemoterapie založená na kombinaci cytosinabinosidu s antracyklinem je vhodná jen jako překlenutí k alogenní transplantaci. Nicméně nový kombinovaný preparát **CPX-351** (liposomální formulace cytarabinu s antracyklinem) povolený recentně v terapii AML, a to i AML s dysplastickými rysy, by mohl být další nadějí u nemocných, kteří již neodpovídají na

demetylační terapii. V současnosti u R/R MDS nemocných probíhají dvě studie (NCT04109690, NCT03957876).

Překonání rezistence na azacitidin je jedno z důležitých témat, kterým se pod vedením prof. Tomáše Stopky zabývá tým lékařů I. interní kliniky VFN a 1.LF UK a BIOCEVU.

K inovacím v terapii azacitidinu patří i přesnější stanovení respondentů. Nové směry využívají umělé inteligence analyzující průběžně laboratorní nálezy u nemocných léčených azacitidinem a identifikující již v prvních 90 dnech terapie pravděpodobné dobré respondenty, u nichž má smysl nadále pokračovat v terapii – na rozdíl od nemocných s negativními výsledky, kteří jsou vhodnými kandidáty nových studiových preparátů.

## ZÁVĚR

MDS je onemocnění definované jako samostatná hematologická jednotka s velkou různorodostí svých podskupin již zhruba 4 dekády. Incidence tohoto někdy vysoce maligně se chovajícího onemocnění stále stoupá. Kurativní terapie je reprezentovaná jen transplantací periferních kmenových buněk. Tato léčba má ale mezi MDS nemocnými pouze málo kandidátů.

Ostatní dosud dostupné léky vedou „jen“ ke zlepšení kvality života či prodloužení přežívání. V posledních letech se ale s rychlým pokrokem ve znalosti patogeneze onemocnění a rozvojem molekulární genetiky objevují některé i cílené, nové, nadějně preparáty, které by mohly přinést další pozitivní krok v terapii MDS. Mnohé z nich jsou v perorální formě a mnohé by navíc mohly vzhledem k cílenému zásahu do určitých drah vzájemně potencovat své účinky.

## Literatura

1. Jonášova A, Čermák J, Červínek L, et al. První zkušenosti České MDS skupiny s terapií 5-azacytidinem u nemocných s myelodysplastickým syndromem s vyšším rizikem (IPSS střední 2 a vysoké riziko), akutní myeloidní leukémií do 30 % myeloblastů a chronickou myelomonocytární leukémií II. Tranfuze hematologie dnes 2013;19:125–133.

2. Bejar R, and Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014;124:2793–2803.

3. Garcia-Manero G, Roboz G, Walsh K, et al. Guadecitabine (SGL-110) in patients with intermediate or high-risk myelodysplastic syndromes: phase 2 results from a multicentre, open-label, randomised, phase 1/2 trial. *Lancet Haematol*. 2019;6:e317–e327.

4. Sébert M, Renneville A, Bally C et al. A phase II study of guadecitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and low blast count acute myeloid leukemia after azacitidine failure. *Hematologica*, 2019;104(8):1565–1571.

5. Garcia-Manero G, Griffiths EA, Steensma DP et al. Oral cedazuridine/decitabine for MDS and CMML: a phase 2 pharmacokinetic/pharmacodynamic randomized crossover study. *Blood*. 2020;136(6):674–683.

6. Garcia JS, Wei A, Borate U et al. Safety, Efficacy, and Patient-Reported Outcomes of Venetoclax in Combination with Azacitidine for the Treatment of Patients with Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome: A Phase 1b Study. *Blood*. 2020;136(Supplement 1):55–57.

7. Zeidan AM, Pollyea DA, Garcia JS et al. A Phase 1b Study Evaluating the Safety and Efficacy of Venetoclax in Combination with Azacitidine for the Treatment of Relapsed/Refractory Myelodysplastic Syndrome. *Blood*. 2020;136(Supplement\_1).

8. Carpentier GR, DeZern AE, DiNardo CD et al. Preliminary Results from the Phase II Study of the IDH2-Inhibitor Enasidenib in Patients with High-Risk IDH2-Mutated Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Blood*. 2019;134(Supplement 1):678.

9. Sallman, DA, DeZern, AE, Garcia-Manero G et al. Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes. *J. Clin. Oncol*. 2021;39:1584–1594.

10. Sallman, DA, Al Malki M, Asch AS et al. Tolerability and efficacy of the first-in-class anti-CD47 antibody magrolimab combined with azacitidine in MDS and AML patients: Phase 1b results. *J. Clin. Oncol*. 2020;38:7507.

11. Sekeres MA, Watts J, Radinoff A et al. Randomized phase 2 trial of pevonedistat plus azacitidine versus azacitidine for higher-risk MDS/CMML or low-blast AML. *Leukemia* 2021;22.

12. Moyo TK, Watts JM, Skikne SB et al. Preliminary Results from a Phase II Study of the Combination of Pevonedistat and Azacitidine in the Treatment of MDS and MDS/MPN after Failure of DNA Methyltransferase Inhibition. *Blood*. 2019;134(Supplement\_1):4236.

13. Brunner AM, Esteve J, Porkka K et al. Efficacy and Safety of Sabatolimab (MBG453) in Combination with Hypomethylating Agents (HMAs) in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) and High-Risk Myelodysplastic Syndrome (HR-MDS): Updated Results from a Phase 1b Study. *Blood*. 2020;136(Supplement 1).

## Na pomezí hematologie a imunologie – genomika vzácných onemocnění krvetvorby

Froňková E.

CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

Nástup sekvenování nové generace (*next generation sequencing* – NGS) znamenal přelom ve výzkumu i diagnostice vrozených chorob. Metoda, která byla zpočátku pouze výzkumná, se velmi rychle stala nepostradatelnou i pro přesnou diferenciální diagnostiku vzácných onemocnění krvetvorby. Rychlý nástup metod NGS do klinické praxe se zpočátku neobešel bez řady výzev ve smyslu organizace a financování vyšetření, multidisciplinární spolupráce, tlaku na rychlost vydání výsledku a jejich sdělování pacientům, návazného genetického poradenství a dalších. Správná diagnóza nebo alespoň vyloučení některých jiných diagnóz jsou ale jednoznačným benefitem, který vyváží úsilí spojené se zavedením správně probíhajících NGS diagnostiky.

Existuje několik přístupů založených na NGS, v klinickém výzkumu se od začátku uplatňují především dva z nich – tzv. celoexomová sekvenace (*whole-exome sequencing* – WES) a sekvenace genových panelů. Celoexomová sekvenace poskytuje sekvenace všech částí genů kódujících proteiny a přilehlých intronických sekvencí. V těchto oblastech se vyskytuje většina variant, které jsou příčinou vrozených onemocnění. Díky tomu WES ve srovnání s celogenomovou sekvenací (WGS) šetří finance, sekvenanční a výpočetní kapacitu, zatímco odhadovaná úspěšnost nalezení kauzální mutace je jen o několik procent nižší než u WGS. Pro WES je nutné použít sekvenátor nové generace s dostatečnou kapacitou (v současnosti jde nejčastěji o přístroje NextSeq, HiSeq a NovaSeq od firmy Illumina). Sekvenace genových panelů poskytuje sekvenace desítek až stovek vybraných genů nebo jejich částí,

ve kterých se nejčastěji vyskytují mutace. Oproti WES má výhodu v lepším (a lépe kontrolovatelném) pokrytí genů a v možnosti sekvenace na přístrojích s menší kapacitou (např. MiSeq od firmy Illumina). Nevýhodou je nemožnost odhalit kauzální genetickou příčinu u pacientů, kde je původní pracovní diagnóza jiná než ta, která se nakonec potvrdí. To byl i případ pacienta s původním podezřením na selhání kostní dřeně. Výsledek WES ukázal homozygotní delecii v genu *SLC19A1*, která způsobuje deficit folátového transportéru vedoucí k megaloblastické anémii, korigovatelné suplementací folátu [1]. U dalšího pacienta s původním podezřením na selhání kostní dřeně ukázalo vyšetření pomocí WES mutaci v genu *ALAS2*, vedoucí k sideroblastické leukémii odpovídající na pyridoxin.

Protože naším výzkumným zájmem jsou mimo jiné poruchy imunity a imunitní dysregulace, snažili jsme se zaměřovat na pacienty, u nichž byl předpoklad zapojení imunitní dysregulace do patogeneze onemocnění. Dosud bylo popsáno více než 400 genů asociovaných s monogenními primárními imuno-deficity a/nebo imunitní dysregulací [2] a další popsané geny neustále přibývají.

Chronická autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) a autoimunitní cytopenie (AIC) jsou vzácná onemocnění, která jsou často součástí komplexních poruch ovlivňujících imunitní systém. Pro další plánování léčby je znalost nebo vyloučení základní genetické příčiny velkou výhodou. Pomocí WES jsme vyšetřili 38 dětí s chronickou AIHA nebo AIC postihující více linií. Z genů již popsaných u PID jsme u 3 pacientů našli haploinsuficienci genu *CTLA4* [3], aktivací mutaci *STAT3* u 2 pa-

cientů, varianty v *NFKB1* u 2 pacientů a u jednotlivých pacientů varianty v *PIK3CD*, *TERT* a *FAS*. Jeden pacient měl dvě patologické varianty (*CTLA4* a *TSCA2*). U dvou sourozenců – dvojčat jsme nově popsali a funkčně charakterizovali variantu v genu *TLR8* (rukopis v přípravě). Dva pacienti měli vzácné varianty potenciálně způsobující onemocnění v genu *JAK2*. Dalšími nálezy byly varianty s nízkou penetrací popsané ve spojení s imunodysregulací v *TNFRSF13B* (3 pacienti) a v *TNFRSF13C* (1 pacient). Jeden pacient měl variantu v genu *KMT2D* způsobující tzv. Kabuki syndrom. U jednoho pacienta vyšetření WES nedokázalo zachytit kauzální delecii genu *IKBKG*, která byla později odhalena metodou MLPA.

Celkově jsme ve vyšetřeném souboru zachytili varianty ovlivňující funkci imunitního systému u 17/38 (44,7 %) pacientů. Podle těchto výsledků se zdá, že u dětí s chronickou AIHA a Evansovým syndromem je v současnosti klinicky nejprůběhovější a zároveň finančně nejvýhodnější strategií použití aktualizovaných genových panelů pro PID namísto celoexomové sekvenace.

### Grantová podpora

Projekt byl podpořen grantem AZV MZ ČR 18-07-00430.

### Literatura

1. Svaton M, Skvarova Kramarzova K, Kanderova V, et al. A homozygous deletion in the *SLC19A1* gene as a cause of folate-dependent recurrent megaloblastic anemia. *Blood*. 2020;135(26):2427–2431.
2. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Ever-increasing array of novel inborn errors of immunity: an interim update by the IUIS Committee. *J Clin Immunol*. 2021;41(3):666–679.
3. Schwab C, Gabrys A, Olbrich P, et al. Phenotype, penetrance, and treatment of 133 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-insufficient subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(6):1932–1946.

# Vrozené anémie s poruchou metabolismu železa

Pospíšilová D.

FN Olomouc

## METABOLIZMUS ŽELEZA V LIDSKÉM ORGANIZMU.

Železo (Fe) je prvek esenciální pro život všech organismů. V buňkách se vyskytuje buď ve formě hemového železa (tj. vázané na protoporphyrin IX) nebo nehemového železa (v interakci s jinými proteinovými ligandy) a hraje nezastupitelnou roli v mnohých důležitých enzymatických procesech. Ovlivňuje metabolismus kyslíku, proliferaci buněk, je součástí cytochromů, ale především krevního barviva hemoglobinu (Hb).

Rovnováha metabolismu železa je nezbytná pro zdraví a přežití organismu. Většina železa v organismu je uložena ve formě zásob, které lidský organismus používá pro důležité buněčné procesy. Stabilní množství železa je přítomno v erytroidním kompartmentu.

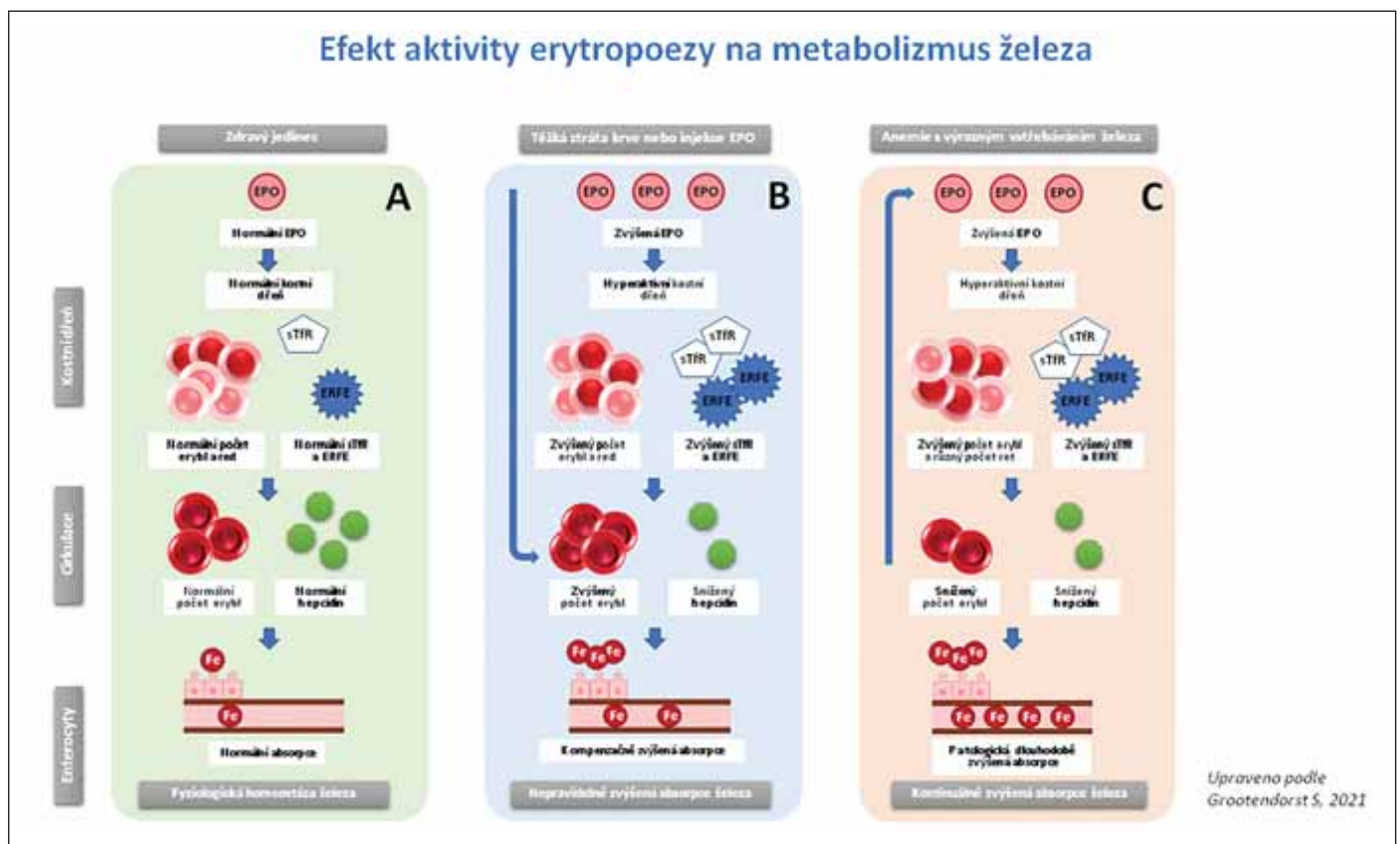
Železo je součástí hemoglobinu a recyklace železa probíhá v důsledku vychytávání stárnoucích červených krvinek ve slezině.

Nevyužité železo, které není navázáno na specifické transportní a/nebo zásobní proteiny, je pro buňku toxické, protože katalyzuje tvorbu nebezpečných kyslíkových radikálů. V organismu se proto vyvinul přísně regulované mechanismy příjmu, transportu a uskladnění iontů železa, na kterých se podílí množství specializovaných proteinů. Hlavním místem vstřebávání železa ze stravy, které je buď v organické formě (hem) nebo ve formě anorganické ( $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ ), jsou **enterocyty duodena** (obr. 1).

Vstřebávání hemového železa je mnohem efektivnější než vstřebávání železa anorganického, navzdory tomu je

tato dráha velmi málo prozkoumána. Na přenosu hemu přes membránu enterocytů se podílí hemový transportér HCP 1 (*heme carrier protein 1*). V enterocytech je železo z hemu uvolňováno působením enzymu hem oxygenázy-1 (HO-1). Uvolněné železo se následně připojí k dráze transportu železa vstřebaného v anorganické formě (obr. 1).

Na počátku procesu vstřebávání anorganického železa se iont  $\text{Fe}^{3+}$  redukuje na  $\text{Fe}^{2+}$  (obr. 1) za účasti duodenální cytochrom b reduktázy (Dcytb).  $\text{Fe}^{2+}$  je následně transportováno do cytoplazmy enterocytů za účasti transmembránového transportéru **DMT1** (divalent metal transporter-1, známý i jako Nramp2). Přijaté železo je podle potřeby buď navázáno na feritin a zůstává jako zásobní železo v enterocytu nebo je dále přená-



Obr. 1. Schéma odpovědi erythropoezy na ztrátu krve / injekci EPO a kontinuální zvýšené vstřebávání železa.

Mechanismus		Výskyt přetížení železem	EPO	sTfR	GDF-15	Hepcidin nebo Ferritin <sup>***</sup>	Erytroferon*
Neefektivní erythropoéza a hemolýza	NTDT	Velmi obvyklý	↑↑	↑	↑	↓	↑
	PKD	Velmi obvyklý	↑	↑	↑	↓	↑
	HbH disease	Obvyklý	↑	↑	↑	↓	↑
	CDA type II	Obvyklý	↑	↑	↑	↓	↑
	SCD	Neobvyklý	↑	↑	↑	↕	↑
Snižená nebo neefektivní erythropoéza	CDA type I	Obvyklý	↑	↑	↑	↓	↑
	DBA	Obvyklý	↑↑	↓	↕	↕	↕
	CSA	Obvyklý	↑	↑	↑	↓	↑
Hemolytická anémie	HS	Neobvyklý	↑	↑	↑	↓	↑
	DHS	Obvyklý	↑	↑	↑	↓	↑

Legenda	
↓	Extremně nízký
↓	Snižovaný
↓	Předpokládaně snížený
↕	Předpokládaně snížený až normální
↓	Snižovaný až normální
↕	Různý
↑	Normální až zvýšený
↑	Předpokládaně zvýšený
↑	Zvýšený
↑↑	Velmi vysoký**
↑↑	Extremně vysoký

Tab. 1. Přehled parametrů erythropoézy a metabolismu železa u vybraných typů vzácných vrozených anémií.

šeno přes bazolaterální membránu a dostává se do krevního oběhu. Zásadní roli v bazolaterálním transportu Fe<sup>2+</sup> hraje membránový protein **feroportin 1** (označovaný i jako IREG1, MTP1), který je zatím jediným známým exportérem železa z buněk a je stejně důležitý i pro transport železa z makrofágů RES, hepatocytů a přes extraembryonální viscerální endoderm. Uvolněné Fe<sup>2+</sup> je účinkem oxidázy hephaestinu oxidováno zpět na Fe<sup>3+</sup>, což v plazmě umožní jeho vazbu na transferin (Tf) za tvorby komplexu Fe<sup>3+</sup>-Tf.

Dle potřeb organismu je železo z oběhu vychytáváno v erytroidních buňkách vazbou na **transferinový receptor 1 (TfR1)**. Železo je primárně skladováno ve formě **feritinu** v enterocytech, erytroidních buňkách v kostní dřeni a hepatocytech.

Hlavním regulátorem příjmu železa do buněk je **hepcidin a tzv hepcidin-feroportinová osa**. Expres hepcidinu na povrchu buněk je převážně indukovaná signální cestou přes kostní morfogenetický protein BMP/Smad při zvýšeném obsahu železa v séru. Alternativní signální dráha je Janus kinase 2 / Signal Transducer and Activator of Transcription3 (JAK2/STAT3) signální dráha, která

je aktivována při zánětu prostřednictvím zvýšení hladiny **interleukinu-6 (IL-6)**. **Zvýšení IL-6 indukuje zvýšení hladiny hepcidinu**. Vysoká hladina hepcidinu blokuje export železa závislý na FPN z enterocyty i hepatocytu do krevního oběhu: indukuje jeho degradaci, což má za následek **omezení absorpce železa z enterocytů do krve a jeho transportu ze zásob železa v hepatocytu a makrofázích do krevního oběhu**. Nově popsaným a dosud zkoumaným důležitým regulátorem metabolismu Fe je **erytroferon (ERFE)**, regulační hormon produkován erytroblasty jako odpověď na stimulaci EPO. Erytroferon tlumí tvorbu a sekreci hepcidinu játry.

**Hodnocení přesného stavu zásob železa** v organismu je náročné a stále má svá úskalí. Historicky byl používán jako základní parametr pro screening zásob železa a přetížení železem **feritin**. Bylo však prokázáno, že hladiny feritinu mohou být u některých typů anémií relativně nízké, zatímco pacienti trpí závažným přetížením Fe. Feritin slouží do jisté míry jako marker zánětu, proto je jeho výpovědní hodnota při stanovení Fe v organismu u zánětlivých stavů nespolehlivá. Dalšími upřesňujícími diagnostickými vyšetřeními pro hod-

nocení stavu železa je **saturnace transferinu (TSAT)**, magnetická rezonance (MRI) srdce a jater a stanovení hladiny železa nevázaného na transferin – tedy volného železa (NTBI). Složitost a úskalí hodnocení poruch metabolismu železa u hematologických onemocnění je možno demonstrovat **na příkladech některých anémií, které mají specifický charakter metabolismu železa**. Některé z nich jsou velmi vzácné, vyskytují se ojediněle, ale na podkladě jejich analýzy byla v posledních letech pochopena řada důležitých aspektů metabolismu Fe.

### VYBRANÉ VROZENÉ ANÉMIE (RARE HEREDITARY ANEMIAS, RHA) S PORUCHOU METABOLIZMU ŽELEZA.

RHA jsou heterogenní skupinou onemocnění způsobených geneticky podmíněnými změnami, které vedou ke zhoršené produkci nebo zvýšené destrukci erytrocytů. Incidence dědičných anémií se liší, např. dědičná sférocytóza a beta-talasemie jsou častější, zatímco Diamondova-Blackfanova anémie, anémie při dysfunkci DMT1 proteinu a anémie při deficitu pyruvátkinázy jsou velmi

vzácné. U každého z těchto typů anémií je přetížení železem běžnou komplikací a může vést k poškození orgánů včetně jaterní fibrózy, srdečního selhání a/nebo dysfunkce endokrinního systému. K tomu dochází všeobecně u pacientů závislých na transfuzích, avšak různý stupeň přetížení Fe se běžně vyskytuje i pacientů, kteří závislost na transfuzích nevykazují. Ačkoli patofyziologie přetížení Fe v důsledku transfuzí je dnes již detailně popsána, u netransfundovaných pacientů se mohou příčiny přetížení podstatně lišit.

O vzájemném působení erythropoézy a homeostázy železa se vede mnoho diskuzí, přesto jsou specifické regulátory metabolismu železa u některých typů těchto anémií do značné míry neznámé. Na příkladech poruch metabolismu Fe u vybraných typů anémií je uveden přehled specifických i běžných regulátorů metabolismu železa s ohledem na mechanismy onemocnění, které jsou unikátní pro jednotlivé anémie. Jsou analyzovány možné příčiny přetížení železem, které mohou objasnit dosud neznámé aspekty metabolismu Fe a přispět k rozvoji terapeutických intervencí.

## REGULACE METABOLIZMU FE U VYBRANÝCH ANÉMIÍ.

Beta-talasémie jsou hemoglobinopatie způsobené patogenními mutacemi v jednom nebo obou beta-globinových genech (HBB). Jsou charakterizovány hemolytickou anémií a neefektivní erythropoézou. Na transfuzi nezávislí pacienti s talasemií (NTDT, dříve beta-thalassemia intermedia) nebo pacienti závislí na transfuzích (TDT, dříve beta-thalassemia major) jsou v riziku rozvoje přetížení železem. Pacienti s NTDT jsou náchylní k rozvoji závažného IO i při absenci vysokých hladin feritinu (feritin < 800 ng/ml). Mechanismus spojující erythropoézu a deregulovaný metabolismus železa v NTDT byl dlouho neznámý, k průlomu v chápání tohoto mechanismu s objevem ERFE však došlo až v posledních letech. Vysoká erythropoetická aktivita vede k drasticky zvýšeným hladinám

ERFE u pacientů s NTDT i u beta-talasmické myši, zejména kvůli pokračující neefektivní erythropoéze, která se odráží ve zvýšených hladinách GDF15 u pacientů. Na základě toho je ERFE v současné době zkoumán jako potenciální farmakologický cíl v NTD. Navíc může zvýšená erythropoetická aktivita vést k retikulocytóze a ke zvýšení sTfR. Kvůli pokračující hemolýze a nedostatečné kompenzaci anémie zůstávají hladiny EPO vysoké, dále stimulují produkci erytroidních buněk a vysokou expresi ERFE. Na základě těchto znalostí se zdá možné, že úrovně ERFE lze odhadnout na základě parametrů erythropoetické aktivity, včetně EPO, počtu retikulocytů a hladin sTfR. To může být extrapolováno i na jiné RHA charakterizované deregulovaným metabolismem železa a zvýšenou nebo neúčinnou erythropoézou a může obohatit porozumění metabolismu železa u jiných RHA.

**Diamond-Blackfanova anémie (DBA)** je autozomálně-dominantně dědičná anémie ze skupiny selhání kostní dřene s izolovaným postižením erythropoézy. Je řazena do skupiny ribozomopatií, její příčinou jsou mutace genů kódujících ribozomální proteiny. Dosud byly popsány heterozygotní mutace v genech kódujících 22 ribozomálních proteinů. Je charakterizovaná erytoblastopenií, retikulocytopenií, vrozenými vadami a predispozicí k rakovině. Přibližně 30 % pacientů je léčeno chronickými transfuzemi, zatímco 35–40 % pacientů reaguje na steroidy, které až dosud byly jediným lékem účinným u DBA. Někteří pacienti jsou nezávislí na léčbě, malá část je indikována k alogenní transplantaci kmenových buněk. U pacientů závislých na transfuzní léčbě se postupně rozvíjí závažné přetížení železem. Informací o stavu železa u pacientů léčených kortikoidy nebo u pacientů bez léčby, u kterých se v literatuře ojediněle udávají zvýšené hodnoty TSAT i hladiny feritinu (42–1 079 ng/ml, průměr 177 ng/ml). Tyto údaje naznačují, že přetížení Fe se může vyskytnout také u pacientů nezávislých na podání transfuzí.

Ukázalo se, že se distribuce železa v DBA liší od jiných RHA. Ve studii porovnávací přetížení Fe definované sérovým feritinem > 1 500 ng/ml nebo LIC > 7 mg/g) u pacientů závislých na transfuzi s DBA, SCD nebo beta-talasemií, hladiny NTBI byly vyšší u DBA než u beta-talasémii i SCD (2,50 mol/l oproti 1,68, resp. 0,23). Hladiny sTfR byly u pacientů s DBA nedetekovatelné, ilustrující snížené zrání erytoblastů. Hladiny hepcidinu byly průměrně zvýšené. To naznačuje, že obsah železa u pacientů s DBA závislých na transfuzi se liší od beta-talasémie. Je to pravděpodobně důsledkem zhoršené absorpce a využití železa v erytroidních prekurzorech, což má za následek zvýšené NTBI. Další studie v kohortě pacientů závislých na transfuzích s SCD, TDT, DBA, PKD, CDA bylo prokázáno, že pacienti s DBA měli celkově nejvyšší hladinu orgánového přetížení Fe, zejména pankreatu a srdce. Společně tyto studie ukazují, že homeostáza železa u DBA je odlišně regulovaná než u jiných anémií, včetně pacientů závislých na transfuzích. Je známo, že DBA se vyznačuje extrémně vysokými hladinami EPO doprovázenými relativní citlivostí EPO. Kromě toho jsou hladiny GDF15 v DBA mírně zvýšené a mají tendenci být vyšší u pacientů léčených glukokortikoidy ve srovnání s transfundovanými a hladiny sTfR lze detekovat také u pacientů reagujících na glukokortikoidy. U pacientů s DBA, kteří reagují na léčbu glukokortikoidy, mohou být hypoteticky hladiny ERFE zvýšené a tito pacienti mohou být vystaveni riziku netransfuznímu přetížení Fe. U všech pacientů s DBA e tedy nezbytné pravidelné hodnocení orgánového přetížení Fe.

**Dědičná sférocytóza (HS)** je relativně častá dědičná hemolytická anémie způsobená defekty v buněčné membráně erytrocytů. Většina kauzálních mutací se vyskytuje v pěti různých genech kódujících membránové proteiny červených krvinek: SPTA1 (alfa-spektrin), SPTB (beta-spektrin), ANK1 (Ankyrin 1), SLC4A1 (pásmo 3 nebo skupina nosičů solute 4) a EPB42 (erytrocytární protein

4.2). Přetížení Fe u HS by teoreticky mělo být neobvyklé, Obecně platí, že u pacientů s HS dochází při zvýšení počtu retikulocytů a zvýšení hladiny EPO ke kompenzaci anémie. U většiny pacientů je anémie v důsledku účinné kompenzace relativně mírná. U pacientů s těžkou anémií nebo jinými komplikacemi HS, jako je splenomegalie a hyperbilirubinemie, je indikována splenektomie, která vede k podstatnému poklesu chronické hemolýzy a zlepšení klinického fenotypu u většiny pacientů. Některé starší histopatologické studie sleziny pacientů s HS ukázaly střední až silnou akumulaci železa. Akumulace železa ve slezině a také rychlá recyklace železa v erytropoéze by mohla vysvětlit, proč je systémové přetížení železem zřídka pozorováno v těžkém stavu u nesplenektomovaných pacientů s HS. Je možno spekulovat, že zmírnění anémie provedením splenektomie by tedy mohlo také normalizovat metabolismus železa. Nedávno byla popsána u čtyř dospělých s mírnou HS (Hb 110–122 g/l a retikulocyty počty 12,6–17 %), k nimž může dojít k přetížení Fe, což dokládá těžké jaterní přetížení Fe u dvou pacientů a zvýšení LIC u dvou dalších pacientů (LIC 6,6 a 6,9 mg/g). Genetické testování vyloučilo HH jako příčinu přetížení železem. To naznačuje, že mírné formy HS mohou být doprovázeny přetížením Fe, ale základní mechanismus nebyl zatím podrobně vysvětlen. Nejvíce náchylní jsou teoreticky pacienti bez kompenzace anémie, protože tito pacienti mají retikulocytózu a trvale zvýšené hladiny EPO. Recentní studie ukázala, že průměrné hladiny ERFE u dvaceti čtyř dospělých pacientů s HS (10/24 post-splenektomie) byly mírně zvýšené ve srovnání se zdravými kontrolami (4 oproti 2 ng/ml), zatímco variace byla vysoká (2–22 ng/ml), doprovázená průměrnými hladinami EPO 14 IU/l (6–31 IU/l) a normálními parametry železa. Přetížení železem je nicméně u HS vzácné a nejpravděpodobněji souvisí s neúčinnou erytropoézou, přesto se může objevit u vybrané skupiny pacientů.

**Deficit pyruvátkinázy (PKD)** je vrozený defekt glykolytického enzymu způsobený mutacemi genu kódujícího pyruvátkinázu (*PKLR*) v játrech a erytrocytech a je charakterizován chronickou hemolytickou anémií. Přetížení železem je u většiny pacientů vážnou komplikací, a to v obou skupinách s odlišným klinickým obrazem: u pacientů na transfuzi závislých i nezávislých bylo přetížení Fe ilustrováno v mezinárodní kohortě pacientů, kde se uvádí vysoká hladiny feritinu v séru (> 1 000 ng/ml) u 38 % pacientů, kteří nebyli pravidelně transfundováni, a zvýšené hodnoty obsahu železa v játrech (LIC) (> 3 mg/g sušiny) u 82 % pacientů. Navíc měli pacienti s PKD s relativně nízkými hladinami feritinu významné přetížení Fe, které se odráží v 90 % senzitivitu pro LIC > 3 g/g u pacientů s hladinami feritinu v séru > 500 ng/ml. Bylo prokázáno, že hladiny hepcidinu u PKD jsou sníženy. Hemolytická anémie u PKD je doprovázena zvýšenými hladinami EPO a kompenzační retikulocytózou, což paradoxně narůstá po splenektomii. Nedávno bylo prokázáno že hladiny EPO a průměrné hladiny ERFE byly zvýšené u většiny srovnávaných pacientů s PKD zve srovnání se zdravými kontrolami. Ačkoli hodnoty hepcidinu nebyly v této studii k dispozici, průměrné hladiny feritinu byly 521 ng/ml (rozmezí 225–781) a 36 % pacientů dostávalo chelatační terapii železem. Vysoké hladiny ERFE u PKD jsou výsledkem zvýšené erythropoetické aktivity a vedou k potlačení hladiny hepcidinu podobně jako u NTDT. Předchozí studie prokázaly, že hladina GDF-15 byla jen mírně zvýšena, což naznačuje nižší stupeň neúčinné erytropoézy u PKD.

### MIKROCYTÁRNÍ ANÉMIE S MUTACÍ DMT1 PROTEINU.

Divalent metal transporter 1 (DMT1) je jedním z klíčových proteinů v regulaci metabolismu Fe. Umožňuje transport Fe do duodenálních buněk a do makrofágů a export Fe z endozomů do cytoplazmy erytroblastů. Od prvního popisu

pacientky českého původu z našeho regionu s mikrocytární anémií způsobenou homozygotní mutací DMT1 v roce 2005 byli popsáni další 4 pacienti s různými mutacemi genu pro DMT1. Anémie u české pacientky byla poměrně závažná s průměrnou hladinou Hb mezi 75–80 g/l. Deficit DMT1 vede u pacientky ke vzniku mikrocytární hypochromní anémie v důsledku snížené utilizace Fe v erytroidních buňkách. Sérový feritin byl jen lehce zvýšen, byla však prokázána **nápadně vysoká hladina sTfR jako důležitý znak deficitu Fe v erytroblastech. V kostní dřeni byla prokázána erytroidní hyperplazie s nepravidelnou hemoglobinizací intermediárních a zralých normoblastů při defektní akvizici Fe vyzrávajících erytroblasty.** U české pacientky bylo překvapivě prokázáno **přetížení Fe v jaterních buňkách** bez známek fibrózy **při normální funkci jater.** Pearlsovo barvení v biotickém materiálu ukázalo výrazná depozita Fe převážně v hepatocytech. V makrofázích nebylo barvitelné Fe nalezeno, což je zřejmě známkou mobilizace Fe z makrofágů. Hladina sérového feritinu byla jen hraničně vyšší i přes známky přetížení Fe. Tento nálezný je možno vysvětlit tím, že Fe zůstává v důsledku abnormální funkce DMT1 proteinu zadrženo v endozomálním / lysozomálním kompartmentu hepatocytů, kde nemůže spustit syntézu feritinu. **V této atypické situaci není hladina feritinu dostatečně výpovědním znakem přetížení Fe v játrech.** Obsah Fe v játrech je možné určit pouze jaterní biopsií nebo magnetickou rezonancí. I přes normální nálezný srdečních funkcí byl magnetickou rezonancí prokázán lehký stupeň hromadění Fe v myokardu. Při změnách hladiny hemoglobinu v průběhu sledování zůstávala konstantní nízká hodnota středního objemu erytrocytů i přes podávání EPO s parciálním efektem na hladinu Hb (+15 g/l).

### ZÁVĚR

Dysbalance rovnováhy železa v organismu, a to jak jeho nedostatek, tak nad-

bytek, jsou v každém případě pro lidský organismus škodlivé. Nadbytek železa může vést ke generování reaktivních forem kyslíku, které mohou poškodit řadu orgánů, především játra, srdce a slinivku břišní. Nadbytek železa v těchto orgánech může vést k rozvoji jaterní cirhózy, srdečnímu selhání a diabetu. Nedostatek železa na druhé straně vede ke vzniku patologických stavů, které mohou mít rovněž výrazný dopad na lidský organismus. Nejčastější příčinou nerovnováhy metabolismu Fe jsou vrozené anémie, jejichž etiologie může být velmi variabilní. Pro hematologa je velmi důležité provést jednak detailní analýzu příčiny anémie včetně genetického vyšetření a použití moderní dostupné metody k včasnému odhalení možného

organového poškození při rozvoji důsledků chronické anémie a/nebo přetížení železem.

### Literatura

1. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142(1):24–38.
2. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A red carpet for iron metabolism. *Cell*. 2017;168(3):344–361.
3. Wang CY, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood*. 2019;133(1):18–29.
4. Barrientos T, Laothamatas I, Koves TR, et al. Metabolic catastrophe in mice lacking transferrin receptor in muscle. *EBio Medicine*. 2015;2(11):1705–1717.
5. Arosio P, Carmona F, Gozzelino R, Maccari-nelli F, Poli M. The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. *Biochem J*. 2015;472(1):1–15.

6. Lakhal-Littleton S, Wolna M, Carr CA, et al. Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(10):3164–3169.
7. Mims MP, Guan Y, Pospisilova Det al. Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood*. 2005;105(3):1337–1342.
8. Volejnikova J, Vojta P, Pospisilova D. et al. Czech and Slovak Diamond-Blackfan Anemia (DBA) Registry update: Clinical data and novel causative genetic lesions. *Blood Cells Mol Dis*. 2020;81:102380.
9. Mims MP, GuanY, Pospisilova D, Priwitzerova M, Indrak K, Ponka P, DivokyV, PrchalJT: Identification of a Human Mutation of DMT1 in a Patient with Microcytic Anemia and Iron Overload. *Blood*. 2005;105(3):1337–1342.
10. Pospisilova D, Mims MP, Nemeth E, Ganz T, Prchal JT. DMT1 mutation: response of anemia to darbepoetin administration and implications for iron homeostasis. *Blood*. 2006;108(1):404–405.

## Nové přístupy k léčbě vrozených anémií

Čermák J.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Patogenetické mechanismy uplatňující se u vrozených hemolytických anémií lze rozdělit do tří skupin: a) defektní tvorba proteinů hrajících roli ve skeletu membrány erytrocytu, b) snížená tvorba enzymů, jež jsou zásadní pro tvorbu energetických zásob krvinky c) mutace genů v některém z kritických míst globinových řetězců mající význam pro funkci erytrocytu.

U poruch struktury membrány nebyly zaznamenány zásadní změny v přístupu k nemocným, a to zejména díky velmi dobrému efektu splenektomie a variabilitě genů uplatňující se při vzniku onemocnění, kdy se zkouší některé níže uvedené metody zvyšující obecně energetický potenciál buňky. U poruch tvorby enzymů erytrocytů jsou vyvíjeny stimulatory funkce genového produktu, u hemoglobinopatií jsou rozvíjeny metody vedoucí k úplné či částečné

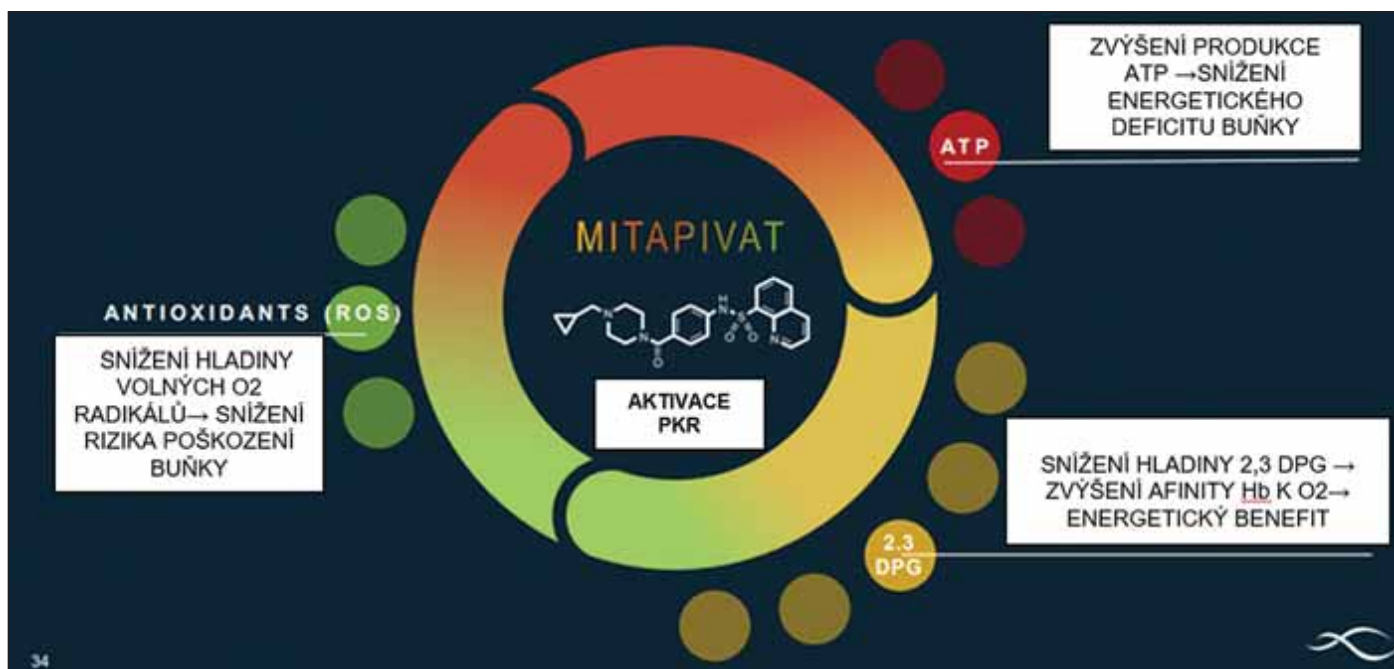
náhradě poškozeného genu. Další metodou je vývoj látek ovlivňujících nepříznivé důsledky vyplývající z inefektivní erythropoézy.

Pyruvát kináza představuje klíčový enzym při tvorbě makroergních fosfátů, a tím při získávání zásob energie pro červenou krvinku. Tvorba pyruvát kinázy je kódována dvěma geny: *PKLR* a *PKM*. *PKLR* se váže na specifický nosič, s jehož pomocí dochází k aktivaci genů *PKR* a *PKL*. *PKM* gen kóduje tvorbu *PKM1* a *PKM2* genů cestou sestřihu určitých exonů *PKM* genu. V červených krvinkách se vyskytuje především *PKR* gen. AG-348 (mitapivat) představuje látku vážící se v erytrocytech alostericky na tetramer *PKR* genů a zvyšující afinitu *PKR* k fosfoenolpyruvátu. Tím dochází ke zvýšení tvorby makroergních fosfátů (obr. 1). Mitapivat byl zatím zkoušen v fázi II. klinických studií, kdy byl nemoc-

ným podáván perorálně ve stoupající dávce 50–300 mg denně, 50 % nemocných odpovědělo během 10 dní léčby vzestupem hodnot Hb > 10 g/l a efekt trval i po skončení studie po 24 týdnech (medián efektu 29 týdnů), efekt byl vázán na přítomnost alespoň jedné mutace *PKLR* genu vedoucí ke snížení hladiny PK. V současné době probíhá multicentrická studie fáze III. podávající mitapivat ve stoupající dávce od 5 mg do 50 mg 2x denně a následně dlouhodobé léčbě minimální efektivní dávkou. Vzhledem k efektu AG-348 na energetické zásoby erytrocytu je tento přípravek v současnosti zkoušen i u srpkovité anémie a dědičné sférocytózy.

U poruch syntézy globinových genů se v současnosti rozvíjejí 2 léčené přístupy: částečná či kompletní náhrada mutovaného genu funkčním genem a tam, kde to není možné, léčba či zmír-





Obr. 1. Mechanismus účinku mitapivatu.

nění nepříznivých důsledky choroby pro organismus.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk (alloSCT) představuje u talasémie i srpkovité anémie kurativní přístup. Z indikačních kritérií po alloSCT jsou považovány nejdůležitější: homozygotní  $\beta$ o talasémie, nemocní mladší 12 let, přítomnost příbuzenského HLA identického dárce, nepřítomnost postižení orgánů či hemosiderózy, SCT není doporučována u nemocných starších 55 let. Celkové pětileté přežití těchto nemocných je při užití myeloablativního přípravného režimu (nejčastěji busulfan + cyklofosfamid) v současnosti cca 81 % (u nemocných mladších 16 let více než 90 %), transfuzní nezávislost je přítomna u 75 % nemocných, rejekce štěpu u 4 % nemocných a mortalita spojená s transplantací činí 7 %. Akutní GVHD (II.–IV. stupeň) byla přítomna 33 % nemocných, chronická GVHD u 20 % nemocných. V současnosti jsou u beta talasémie zkoušeny všechny typy předtransplantačních režimů, včetně kombinace redukováného režimu (fludarabin + busulfan + ATG) s předlčením 2 cykly kombinace fludarabinu s kortikoidy

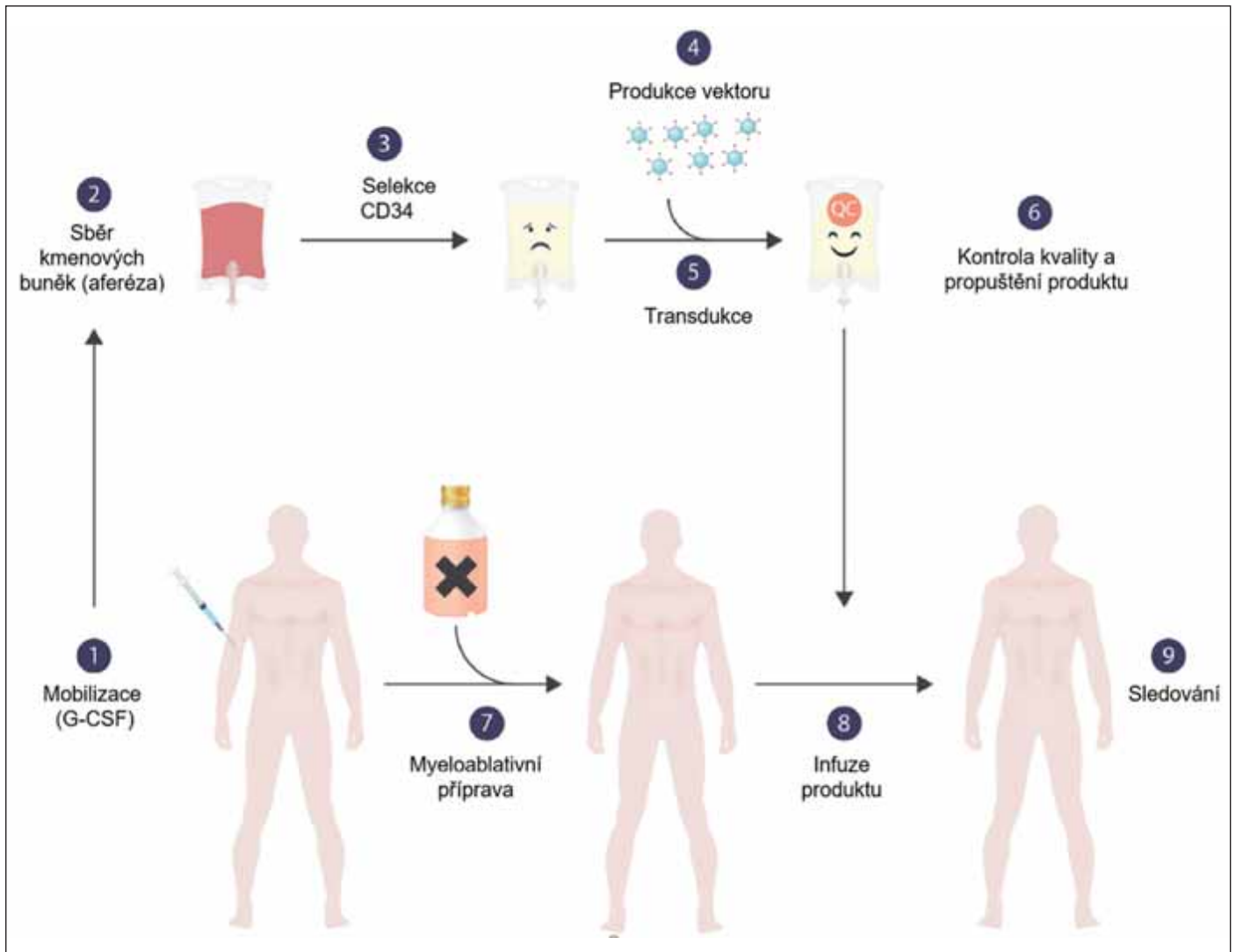
U srpkovité anémie jsou hlavními indikačními kritérii věk pod 16 let, přítom-

nost HLA identického příbuzného dárce, nedostatečný efekt podávání hydroxyurey a minimální plicní komplikace. Celkové přežití 5 let je u těchto nemocných téměř 90 %, přežití bez komplikací činí 81 %, rejekce štěpu byla přítomna u 2 % nemocných, stejně tak jako mortalita při SCT, akutní GVHD byla přítomna u 15 % nemocných, chronická GVHD u 14 % nemocných.

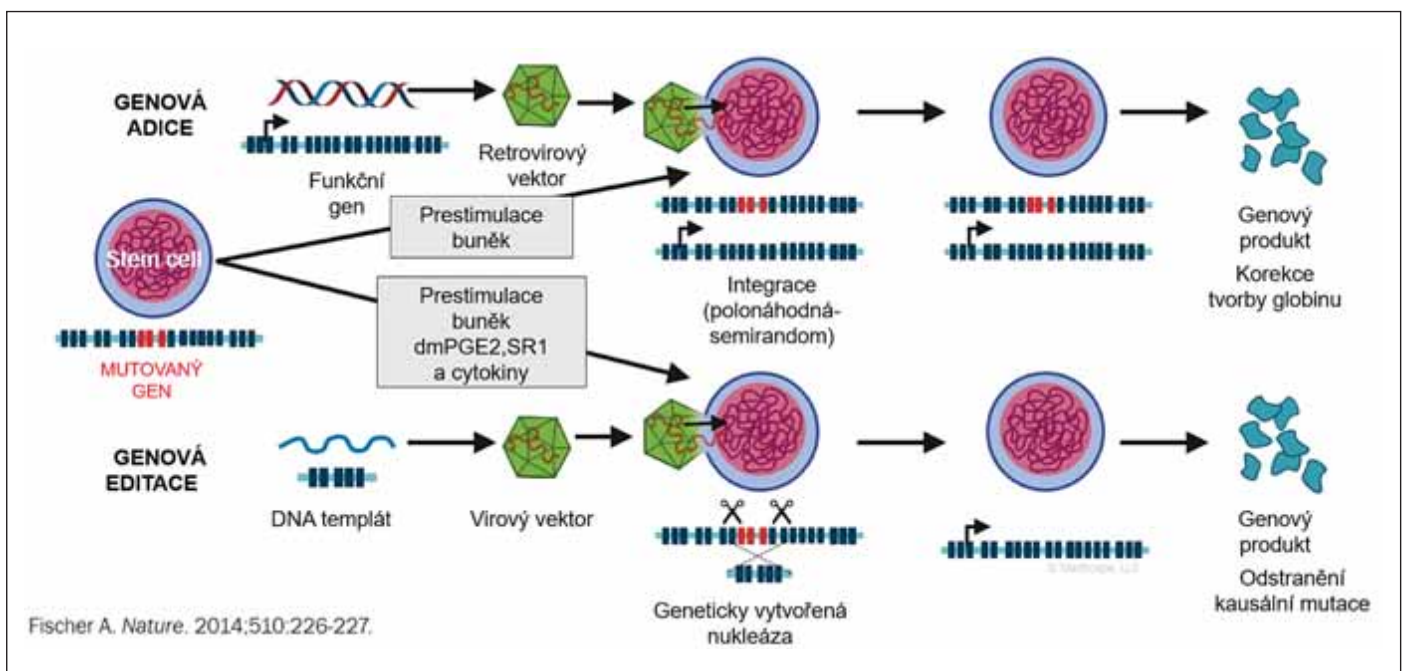
V genové terapii hemoglobinopatií se uplatňují 2 metody, genová adice a genová editace (obr. 2). Genovou adicí rozumíme vnesení modifikovaného genu pro tvorbu globinu, jenž je do určité míry schopen korigovat sníženou tvorbu beta globinu (obr. 3). V první fázi jsou po stimulaci G-CSF odebrány pomocí aferéz CD34+ buňky nemocného, které jsou následně transdukovány ex vivo lenti-virovým vektorem (BB305), jenž umožňuje vnesení modifikovaného funkčního genu pro tvorbu globinu (gen pro tvorbu HbA se záměnou aminokyselin v pozici T87Q). Po podání myeloablativního přípravného režimu obsahujícího busulfan jsou modifikované CD34+ buňky podány zpět s následným přihojením infundovaných buněk a tvorbou HbA T87Q. U nemocných s beta talasémií, kteří neměli homozygotní formu  $\beta$ o

talasémie, došlo k vymizení závislosti na transfuzích u 99 % nemocných s korekcí inefektivní erytropoézy a hodnotami Hb mezi 82–137 g/l, u homozygotů s  $\beta$ o talasémií byl pokles počtu podaných transfuzí pozorován u 73 % nemocných, přičemž u 33 % pacientů byla přítomna transfuzní nezávislost. U nemocných nebylo pozorováno odhojení štěpu ani závažnější forma GVHD. U 6 % nemocných byl přítomen v různě dlouhém intervalu od léčby pomocí lentivirového faktoru vznik malignity (většinou lymfoproliferace). U nemocných se srpkovitou anémií byla nezávislost na transfuzích po léčbě genovou adicí pozorována u 75 % nemocných bez předchozích komplikací choroby a 73 % nemocných s předcházející zejména plicní komplikací, hodnoty Hb se pohybovaly mezi 114–130 g/l a u nemocných s předchozím závažným průběhem choroby byl cca u třetiny pozorován výskyt venookluzivní choroby či akutního plicního syndromu. V současnosti je lentivirový vektor s genem pro HbA T87Q již komerčně vyráběn (přípravek Zynteglo).

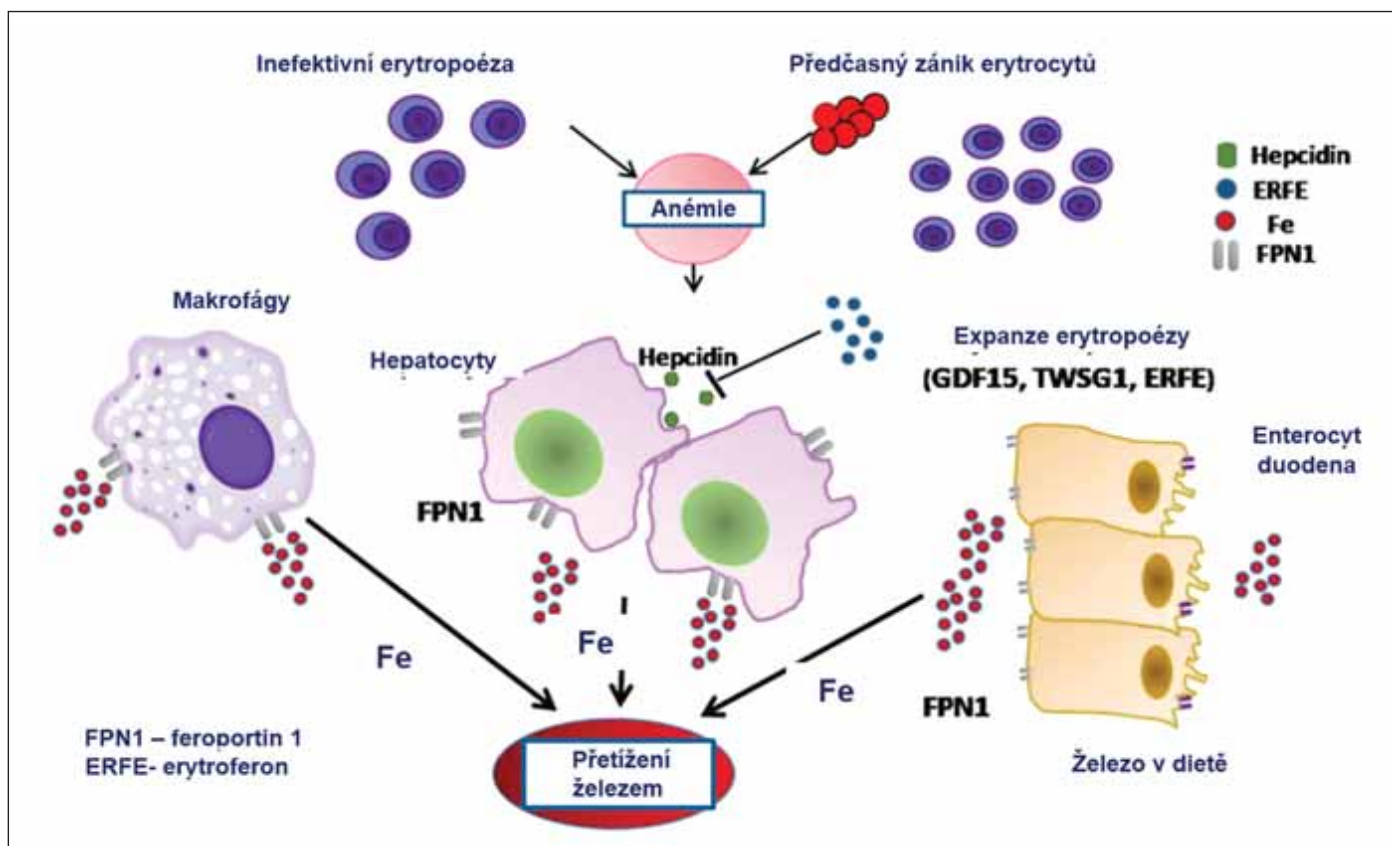
Genová editace znamená odstranění kauzální mutace v globinovém genu (obr. 3). CRISPR-Cas9 je bakteriální systém umožňující bakteriím odstranit



Obr. 2. Princip genové terapie.



Obr. 3. Genová adice a genová editace.



**Obr. 4. Rozvoj přetížení železem u talasémie.**

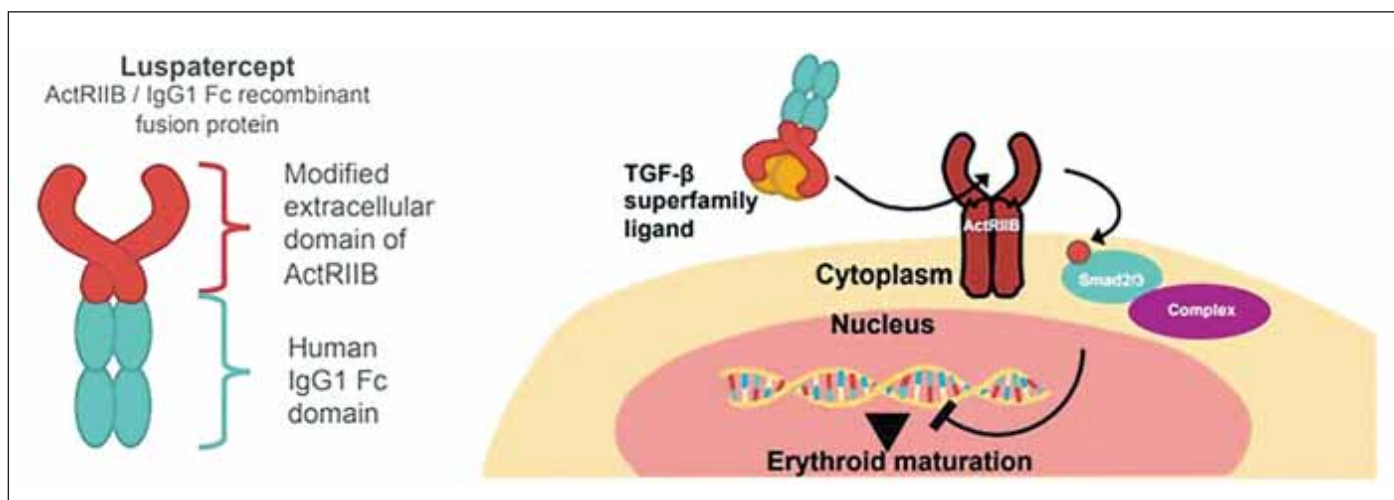
Inefektivní erythropoéza s předčasným zánikem erytrocytů vede k anemizaci tkání, dochází ke zvýšení tvorby erythropoetinu, stimulaci erythropoézy a tvorby erythroferonu (ERFE), jež má tlumivý účinek na tvorbu hepcidinu, který za normálních okolností degraduje ferroportin (FP1). Zvýšená hladina ferroportinu stimuluje výdej železa do cirkulace z buněk monocytomakrofágového systému, z hepatocytů a z enterocytů (čímž sekundárně zvyšuje resorpci Fe z GIT), tím vniká přetížení železem, jež je potencováno dodanými transfuzemi erytrocytů.

bakteriofágy a eliminovat cizorodý genetický materiál. CRISPR (clustered regularly interspaced short *palindromic repeats* – clustery pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetičí) jsou úseky prokaryotické DNA obsahující krátké repetice nukleotidů. Každou z repetičí následují krátké segmenty tzv. spacer DNA, získané při předchozích setkáních s určitými exogenními podněty. Systém CRISPR-Cas9 využívá dvě nekodující CRISPR RNA (gRNA) vzniklé transkripcí štěpených úseků spacer DNA, a to crRNA, jež sekvenčně odpovídá cílové sekvenci DNA, a transdukční tracrRNA jež je jejím komplementárním obrazem a napomáhá plnému dozrání crRNA do funkčního stavu, obě RNA se v současných technikách sdružují do jedné chimerické RNA (scRNA). Tzv. Cas9 protein má nukleázovou aktivitu a indikuje specifický dvouvláknový zlom DNA. Jed-

notka gRNA navede Cas9 protein na specifický genomový lokus pomocí párování bází mezi sekvenací crRNA a cílovou sekvenací. Následuje štěpení DNA v požadovaném místě a zlom je opraven prostřednictvím buněčných reparačních mechanismů. Při reparaci pomocí homologní rekombinace vede současná transfekce upravenou dárcovskou DNA k opravě s vyřazením poškozeného genu či s vnesením jednoho či více jiných genů. V současné době jsou zatím experimentálně používány DNA s lentivirovými vektory ovlivňující aktivitu BCL11A transkripčního faktoru tlumícího aktivitu  $\gamma$  globinového genu, což vede ke stimulaci tvorby HbF. Další metodou je kombinace vektorů ovlivňujících imbalance  $\alpha$  a  $\beta$  řetězců útlumem tvorby HbA2 a současnou stimulací HbA2 promotoru vedoucí ke zvýšené produkci  $\beta$  globinu. U všech dosud léčených ne-

mocných s beta talasémií či srpkovitou anémií bylo dosaženo transfuzní nezávislosti a vymizení vaso-okluzivních krizí, příprava nemocných byla identická jako u genové adice (stimulace a sběr CD34+ buněk a infuze transfekovaných buněk po myeloablativní přípravě).

Zmnožení inefektivní erythropoézy do různé míry vyjádřené u různých hemolytických anémií vede k anemizaci spojené s tkáňovou hypoxií. Hyperplazie erythropoézy spolu s hypoxií vedou cestou sekrece erythropoetinu k indukci tvorby erythroferonu. Cestou signální dráhy BMP-SMAD vede erythroferon k útlumu transkripce DNA pro hepcidin. Funkcí hepcidinu je degradace ferroportinu – proteinu zodpovědného za výdej Fe extracelulárně. Snížená hladina hepcidinu u stavů s inefektivní erythropoézou je důsledkem vysoké hladiny erythroferonu, jež má za cíl udržení



**Obr. 5. Mechanismus účinku luspaterceptu.**

Luspatercept obsahující lidský aktivin IIB receptor se váže pomocí TGF ligand na aktivin, následně inhibuje alterovanou SMAD 2,3 signální dráhu, čímž tlumí inefektivní erytropoézu a navozuje normální diferenciaci a maturaci erytrocytů.

dostatečného příjmu Fe pro hyperplastickou erytropoézu, Dochází ke zvýšení výdeje Fe z enterocytů, makrofágů a hepatocytů a sekundárně ke zvýšené resorpci Fe z GIT (obr. 4). Výrazně snížená hladina hepcidinu je přítomna u nemocných s talasémií intermedia, kteří nejsou transfundováni, u thalassemia major bývá snížení hladiny menší díky částečné korekci hypoxie dodávanými transfuzemi. V současnosti jsou rozvíjeny léčebné metody ovlivňující stupeň inefektivní erytropoézy či zvyšující hladinu hepcidinu.

TGF- $\beta$  (*transforming growth beta*) superfamily aberantně aktivuje cestou aktivinu SMAD 2/3 signální dráhu a ovlivňuje negativně pozdní stadia erytropoézy. Luspatercept obsahuje extracelulární doménu lidského receptoru pro aktivin-IIB vázanou na IgG, vazba na aktivin blokuje SMAD-2/3 signální dráhu, tlumí inefektivní erytropoézu, a podpo-

ruje maturaci a terminální diferenciaci erytroidní řady (obr. 5). Efekt luspaterceptu byl prokázán u myelodysplastických syndromů a též u beta talasémie. V randomizované studii fáze III. u beta talasémie bylo dosaženo podáváním luspaterceptu poklesu počtu transfuzí o nejméně jednu třetinu u 21,4 % nemocných po 24 týdnech a 19,6 % po 48 týdnech, pokles počtu transfuzí o více než 50 % byl přítomen u 7,6 % a 10,3 % nemocných, transfuzní nezávislost byla dosažena u 11 % nemocných. Luspatercept (přípravek Reblozyl) je v současnosti již v EU vč. ČR registrován.

Přípravky ovlivňující tvorbu hepcidinu či ferroportinu jsou stále ve fázi časného klinického zkoušení. Jedná se o analogy hepcidinu (minihepcidiny), látky stimulujičící či jinak ovlivňující signální dráhu hepcidinu (anti-TMPRSS6, monoklonální protilátka proti BMP6), nebo látky stimulujičící tvorbu ferroportinu.

## Literatura

- Grace RF, Rose C, D. Layton, et al. Safety and efficacy of mitapivat in pyruvate kinase deficiency. *N Engl J Med.* 2019;381:933–944.
- Mohamed SY. Thalassemia major: transplantation or transfusion and chelation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2017;10:290–298.
- Li C, Mathews V, Kim S et al. Related and unrelated donor transplantation for  $\beta$ -thalassemia major: results of an international survey. *Blood Adv.* 2019;3:2562–2570.
- Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med.* 2018;378:1479–1493.
- Walters MC. Induction of fetal hemoglobin by gene therapy. *N Engl J Med.* 2021;384:284–285.
- Pavani G, Fabiano A, Laurent M et al. Correction of  $\beta$ -thalassemia by CRISPR/Cas9 editing of the  $\alpha$ -globin locus in human hematopoietic stem cells. *Blood Adv.* 2021;5:1137–1153.
- Cappellini MD, Taher AT. The use of luspatercept for thalassemia in adults. *Blood Adv.* 2021;5:326–333.
- Camaschella C, Nail A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica* 2020;105:260–272.

# Pozice podpůrného týmu v hematologickém centru

Kouba M.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

## POJMY, JEJICH VÝZNAM A VNÍMÁNÍ

Podpůrným týmem v následujícím textu nazývám multidisciplinární tým poskytující paliativní péči v duchu její moderní definice [1]. Pojmové a významové zmatení, co je to paliativní péče a co je podpůrná péče, je značné. Zatímco většina obecné populace i zdravotníků vnímá paliativní péči jako péči na konci života, definice paliativní péče hovoří o něčem zcela jiném: „Paliativní medicína je specializovaný medicínský obor, který se zabývá péčí o pacienty se závažným onemocněním. Jde o péči zaměřenou na úlevu od příznaků a zátěže způsobené nemocí. Cílem je zlepšit kvalitu života jak pacientů, tak jejich blízkých. Multidisciplinární specializovaný paliativní tým spolupracuje s pacientovým ošetřujícím lékařem a přináší novou vrstvu podpory. Paliativní péče vychází z potřeb pacienta, nikoli z jeho prognózy. Je poskytována v každém věku a stadiu nemoci a může být poskytována současně s léčbou zaměřenou na vyléčení.“ [1]. Paliativní péče je ale vnímána jako péče o umírající a v prostředí výkonově zaměřené moderní medicíny i celé společnosti často budí strach a odmítnutí. Mnohé paliativní týmy ve světě se proto účelově přejmenovávají, aby se vyhnuly stigmatizaci slovem „paliativní“. Stejná je i naše zkušenost, proto „podpůrný tým“.

## SOUČASNÁ POZICE PALIATIVNÍ MEDICÍNY VE VZTAHU K JINÝM OBORŮM A SPECIFIKA HEMATOLOGIE

Podpůrná a paliativní péče je neoddělitelnou součástí léčby mnoha život ohrožujících onemocnění a svými pozičními články a doporučeními to jasně vyjadřují i významné odborné společnosti jako ASCO, ESMO v onkologii nebo například

AHA v kardiologii [2–4]. Mezinárodní ani národní hematologické společnosti ve svých doporučeních dosud takto jasně nehovoří, ale narůstající evidence v hematologii, která se zpožděním kopíruje výzkum v onkologii a dalších oborech velmi pravděpodobně povedou k větší standardizaci a dostupnosti paliativní péče pro hematoonkologické pacienty. Hematoonkologie je v tomto směru pozadu, uvádím několik možných důvodů:

- Hematoonkologičtí pacienti jsou léčeni vysoce intenzivními protokoly s vysokou mírou závislosti a velkou individuální vazbou na své hematologické centrum. Hematolog je zvyklý vést péči o svého pacienta sám, což umožňuje pěstovat silný a pozitivní vztah lékař-pacient, ale také neposkytuje prostor pro sdílení péče s odborníky na paliativní péči, případně to vede k jejich pozdnímu zapojení.
- Určitá izolovanost hematologických center se specifickou kulturou komunikace a paradigmatem vnímání rizik a prognózy, lékařské týmy s lokálně zakořeněnými hodnotovými žebříčky.
- Velmi komplexní a mnohdy nejisté prognózování zvláště za užití moderních transplantačních a buněčných terapií, „Kaplan-Meierovy křivky zvláště v transplantační medicíně mívají vždy nějaký ocas“ [5].
- Dependence na transfuzích podporující setrvání pacienta v nemocničním prostředí nebo ve vazbě na nemocnici.
- Silnější tendence hematologů (ve srovnání s onkology) podávat chemoterapii i v nízkém performance stavu a v závěru života.

## BUDOVÁNÍ PODPŮRNÉHO TÝMU V HEMATOLOGICKÉM CENTRU

V ÚHT jsme stále na dlouhé cestě k funkčnímu multidisciplinárnímu týmu.

Částečně i proto, že nebylo lehké získávat zkušenosti a inspiraci jinde. Náš tým byl nejprve ovlivněn paliativní komunitou v České republice, která před pěti deseti lety měla těžiště v hospicové a mobilní hospicové péči. Fungující nemocniční paliativní týmy rychle a úspěšně vznikají za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR až v posledních letech. Zásadní pro nás tedy byly zkušenosti ze zahraničí a úzký kontakt s Klinikou paliativní medicíny 1. LF UK a VFN, první svého druhu v ČR. V literatuře jsou dobře popsány problémy, nástrahy a frustrace, které jsou s budováním podpůrného týmu spojené. Některé naše chyby a slepé uličky v průběhu let nabízím v tab. 1.

Centrální je zde vztah s ošetřujícím týmem. Hematolog se stejně jako každý jiný lékař snaží podle svých nejlepších schopností a s maximální empatií komplexně pečovat o „svého“ pacienta. O to obtížnější je pro něj v každodenní praxi pod časovým tlakem vyhodnotit, že potřebná časová a odborná investice do případu pacienta přesahuje možnosti či zkušenosti hematologa a je vhodné požádat o asistenci podpůrný tým. Formulovat žádost o podporu a komunikovat to pacientovi je samo o sobě složité. Hodnotové žebříčky se mezi lékaři liší, což vyžaduje respekt ze strany podpůrného týmu. V mantinelech představených čtyřmi základními etickými principy mívají různí lékaři tendenci preferovat beneficenci, nonmaleficenci, autonomii či spravedlnost. Rozdíly jsou významné a je dobré s nimi počítat.

## POPIS AKTUÁLNÍHO STAVU V ÚHKT PRAHA

Tým složený z lékařů, sester, psychologů, kaplana a sociální pracovníce stále více koordinuje svou činnost, věnuje se

Tab. 1.

Nefunkční strategie	Zdůvodnění
Otevření ambulance paliativní péče s očekáváním předávání a referování pacientů indikovaných k paliativní péči.	Odeslání pacienta do paliativní ambulance v době léčebných neúspěchů není pro hematology přijatelné, lépe funguje sdílený model péče, kdy pacient nepřerušuje svůj vztah k ošetřujícímu hematologovi a jako další vrstvu péče využívá podpůrného týmu.
Soustředění se na utrpení pacienta více nežli na „zakázku“ ošetřujícího hematologa s domněním, že vím lépe než ošetřující hematolog, co pacientovi nyní nejlépe uleví.	Jde o zásadní překročení vztahu hematolog – paliativní konziliář. Slovy Diane Meier „Budete-li se donkichotsky snažit zachránit pacienty před jejich lékaři, povede to rychle k ukončení Vaší konziliární činnosti“ [6].
Soustředění se na téma terminální péče a dobrého umírání přinesením dobré praxe z hospicového prostředí.	Je to důležité, ale jsou-li to hlavní témata práce paliativního týmu, podporuje to a buduje stigma paliativního týmu a komplikuje do budoucna spolupráci s lékaři i pacienty.
Podpůrný tým pracující s velkou energií a entuziasmem s mnoha pacienty napříč odděleními.	Někdy je pak podpůrný tým špatně čitelný pro okolí, nemá dostatečně hierarchickou strukturu zvyklou v nemocničním prostředí, někdy chybí jasně definovaná zodpovědnost.

pacientům na žádost ošetřujícího hematologa či primáře oddělení. Psycholožky, kaplan a sociální pracovnice nabízejí své služby všem hospitalizovaným pacientům i bez vyzvání lékařem. Nejčastějšími indikacemi k přizvání podpůrného týmu ze strany hematologa je plán péče u pacientů s očekávanou krátkou dobou života či vysoce rizikovou hematologickou malignitou, řešení sociální situace, psychologická podpora pacienta a rodiny a zprostředkování spolupráce s paliativními zařízeními. Stále převládají žádosti o konziliární spolupráci v případech krátké prognózy či v terminálních stavech. V posledních dvou letech probíhá také pilotní projekt časné integrace podpůrné a paliativní péče do terapie nekurativně léčených pacientů s AML v ambulantních podmínkách, kdy spolupráce AML skupiny a podpůrného týmu začíná již ode dne diagnózy a má danou strukturu inspirovanou podobným projektem z Memorial Sloan Kettering Cancer Center v New Yorku [7]. Daří se nám tak bez „paliativní“ stigmatizace zapojit do péče o všechny konsekutivní pacienty.

## SMĚŘOVÁNÍ A CÍLOVÝ STAV

V bodech uvádím, kam bychom se rádi ve svém snažení dostali:

- Multidisciplinární tým je složený z lékařů vzdělaných v paliativní medicíně, sester, psychologů, duchovních, so-

ciálních pracovníků. Ti spolu úzce spolupracují a tvoří jedno z oddělení nemocnice, soustředí se na udržení či zlepšení kvality života pacientů se závažným onemocněním a jejich rodin. Dosahují toho podporou hematologického týmu a spoluprací s ním. Péče o symptomy, komunikace, sociální, psychologická a spirituální podpora jsou významnými oblastmi zaměření podpůrného týmu.

- Podpůrný tým staví na respektu k primárnímu hematologickému týmu, který je – většinou v osobě ošetřujícího hematologa – zadavatelem/indikujícím.
- Je nastaven funkční stav identifikace pacientů s velkou potřebou podpůrné péče tak, aby nabídku péče podpůrným týmem všichni takoví pacienti dostali.
- Existuje funkční systém vzdělávání pro členy týmu a také předávání nabytých znalostí a zkušeností hematologickému týmu. Podpůrný tým své výsledky a zkušenosti přehledně a aktivně publikuje.
- Funguje úzká spolupráce s paliativními lůžkovými i mobilními zařízeními v celé republice a pacientům s nevyléčitelným onemocněním se na konci života dostává expertní péče včetně podpory jejich blízkým a pozůstalostní péče.
- Pro definované skupiny vysoce rizikových pacientů existují protokoly časné

integrování paliativní péče po vzoru evidence z literatury, která jasně prokazuje jejich prospěšnost, jsou-li implementovány již od doby diagnózy [8].

- Členové týmu nabízejí podporu také personálu ÚHK.

## Literatura

1. <https://www.capc.org/about/palliative-care/>.
2. Ferrell BR, Temel JS, Integration of palliative care into standard oncology care: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline, JCO 2016;35:96–112.
3. Jordan K, Aapro M, European Society for Medical Oncology (ESMO) position paper on supportive and palliative care, Annals of Oncology. 2018;29(1):36–43.
4. Braun LT, Grady KL, Kuttner, JS. Palliative care and cardiovascular disease and stroke: a policy statement from the American Heart Association/American Stroke Association. 2016;134(11):e198–e225.
5. Odejide OO, alas Coronado DY, Watts CD. End-of-life care for blood cancers: a series of focus groups with hematologic oncologists. J Oncol Pract 2014;10(6):e396–e403.
6. Meier DE, Beresford L. Consultation etiquette challenges palliative care to be on its best behaviour. Journal of Palliative Medicine. 2007;10(1):7–11.
7. Desai AV, Klimek V, Chow K: 1-2-3 Project: a quality improvement initiative to normalize and systematize palliative care for all patients with cancer in the outpatient clinic setting. J Oncol Pract. 2018;14(12):e775–e785.
8. El-Jawahri A, LeBlanc T et al, Effectiveness of Integrated palliative and oncology care for patients with acute myeloid leukemia. JAMA Oncol. 2021;7(2):238–245.

## Specifika podpůrné léčby inovativních terapií (nové léky a jejich komplikace)

Žák P.

IV. interní hematologická klinika FN Hradec Králové  
Katedra interních oborů, LF Hradec Králové, UK Praha

Léčba hematologických onemocnění a malignit má svá specifika. Podpůrná péče umožňuje provedení léčby s dodržáním optimálního dávkování léků a léčebných cyklů za současného snížení rizika komplikací, které tyto léčby provází. Ve sdělení jsou v úvodní části zvýrazněna specifika hematologické podpůrné péče, ve druhé části je přehledně upozorněno na nové situace, které provází inovativní léčebné postupy.

Pacienti léčení pro hematologická onemocnění a hematologické malignity (leukémie, lymfomy a myelom) mají široké spektrum život ohrožujících infekčních a neinfekčních komplikací. Léčebné protokoly obvykle obsahují kombinaci cytostatik a léků s imunosupresivním efektem. Tato léčba přechodně vede ke zvýšenému riziku závažných oportunních infekcí. Jedním z klíčových problémů u těchto pacientů je správné profylaktické zajištění v období neutropenie, dále správná volba preemptivních a empirických postupů při léčbě

febrilní neutropenie/sepse. U většiny pacientů léčených intenzivními postupy je nutná substituce erytrocytů a krevních destiček. Rutinním postupem je aplikace G-CSF nejen u neutropenických epizod, ale též v profylaktickém režimu. Kortikoidy a široce používaná imunoterapie s anti-CD20 protilátkou navozuje významný a protrahovaný (6–9měsíční) defekt v buňkami zprostředkované imunitní odpovědi. Do spektra rutinní podpůrné péče jsou zahrnuty nutriční support a rehabilitační a psychologická péče.

Specifickou skupinu tvoří pacienti s mnohočetným myelomem, kde je nutná rutinní léčba kostního postižení a bolesti.

Další samostatnou skupinu tvoří pacienti po transplantaci hematopoetických buněk. U této skupiny je nutná komplexní podpůrná péče nejen v období transplantační léčby, ale obvykle v různé míře dlouhodobá a často i celoživotní.

V hematologii jsou nově zaváděny nové léky a postupy, které vedou ke specifickým reakcím a metabolickým či imu-

nitním komplikacím. Ve sdělení jsou podrobněji diskutovány tyto situace:

- a) zvýšené riziko syndromu lýzy tumoru u terapie CLL venetoclaxem;
- b) dlouhodobá lymfodeplece a neefektivní odpověď na očkování u anti-CD-20 protilátek;
- c) falešná pozitivita nepřímého antiglobulinového testu u anti-CD38 protilátek;
- d) syndrom lýzy tumoru a neurotoxicita u bispecifické protilátky anti-CD3/19;
- e) léky prodlužující QT interval – FLT3 blokátory u AML, ATO u APL, aj;
- f) trombocytopenie při terapii ibrutinibem;
- g) vysoké riziko meningokokových sepsí v důsledku blokády komplementu-C5 při léčbě eculizumabem u PNH a a-HUS;
- h) irAEs – „immune-related adverse events“ u „check point inhibitorů“ (anti-PD1 a anti-CTLA4);
- i) syndrom cytokinové reakce u CAR-T cell léčby.

## Survivorship programy pro pacienty s hematologickými malignitami

Drgoňa E.

Klinika onkohematologie LF UK a Národního onkologického ústavu, Bratislava

V současnosti vieme účinne liečiť väčšinu pacientov s hematologickými malignitami a podstatnú časť dokážeme aj vyliečiť. Každoročne tak pribúda pacientov, ktorí sa okrem navždy prítomného stra-

chu z recidívy nádorového ochorenia musia obávať aj fyzických, psychických ako aj sociálnych dlhodobých následkov prameniáciach z podstaty diagnózy a náročnej liečby. Potreba ustanovenia

a ukotvenia odporúčaní na monitorovanie, skrining a prevenciu dlhodobých, neskorých komplikácií protinádorovej liečby na základe princípov EBM vychádza nielen z prirodzených potrieb pa-

cientov a ich rodín ale aj zo základného princípu medicínskeho snaženia. Prinášame pacientom najmodernejšie možnosti terapie ich chorôb, avšak na dlhodobé potenciálne následky často dostatočne a do dôsledkov nemyslíme. Viaceré odborné skupiny uvedenú problematiku koncepčne riešia, avšak prenesenie odporúčaní sledovania prežívajúcich pacientov nebýva často v praxi realizované. Neskoré následky protinádorovej liečby sú pritom dobre známe, veľa sme sa naučili z pediatrickej (hemato)onkológie, kde 80 a viac percentná úspešnosť liečby logicky prináša dostatok skúsenosti s prežívajúcimi pacientami. Podobne pacienti po transplantácii krvotvorných buniek mali ako jedni z prvých k dispozícii odporúčania na dlhodobé sledovanie [1]. Hodgkinov lymfóm (HL) patrí k nádorom, ktoré aj v ranej ére systémovej protinádorovej liečby prinášali vysoký počet vyliečených pacientov alebo v dlhodobej remisii. Preto slúži ako dobrý model pre sledovanie neskorej toxicity dlhodobo prežívajúcich/vyliečených aj v súčasnosti, keď sa úspešnosť liečby zvyšuje. Podľa nedávnej analýzy vyše 20 000 amerických pacientov s HL vo veku 20–74 rokov liečených v rokoch 2000–2015 zaznamenali takmer 17% úmrtí, z ktorých bolo takmer 40 % spôsobených inou príčinou ako lymfómom. Najčastejšími príčinami boli ochorenia srdca, infekcie a intersticiálne pľúcne choroby [2]. Navyše sa v tejto skupine pacientov stretávame aj so špecifickou toxicitou po transplantáciách krvotvorných buniek. Je preto prirodzené, že sa naša pozornosť obracia na kvalitu života prežívajúcich pacientov a ich zdravie po úspešnej protinádorovej liečbe.

Všeobecne je riziko neskorých následkov a ich závažnosť odvodená od štádia ochorenia, typu a dĺžky protinádorovej liečby, veku, ale aj prítomnosti ostatných, všeobecných rizikových faktorov (fajčenie, vysoký tlak, obezita). Neskoré následky/komplikácie hematologických pacientov prežívajúcich po protinádorovej liečbe delíme na nemalígne a ma-

lígne (nové primárne malignity). Základ neskorých následkov vzniká subklinicky už počas liečby [3]. Preto sa aj starostlivosť nezačína až po jej skončení. Všeobecne možno povedať, že snahou by malo byť dosiahnutie primeranej kvality života počas liečby a po jej skončení tak, aby kľúčové aspekty života každého individuálneho pacienta boli preňho uspokojujúce [4].

Najčastejšími neskorými následkami liečby hematologických malignít s možnými fatálnym výstupom sú sekundárne malignity a kardiovaskulárne ochorenia. Napr., pacienti s Hodgkinovým lymfómom majú 2–4-násobne vyššie riziko vzniku sekundárnych malignít (kumulatívna incidencia 2. malignity po 40 rokoch sledovania je 48,5 %) a kardiovaskulárnych ochorení v porovnaní s bežnou populáciou [5]. Preto je ich doživotné sledovanie nevyhnutnou súčasťou observačných programov. Prevenciu kardiovaskulárnej morbidita a mortality sa venuje viacerým odporúčaniam, rutínne sledovanie a skrining vysokorizikových pacientov môže viesť k intervenciám, ktoré zastavia progresiu alebo zmiernia dysfunkciu [6].

Pneumotoxicita a endokrinopatie po liečbe môžu prebiehať niekedy subklinicky alebo len s diskretnými symptómami avšak ich včasné podchytenie je dôležité pre účinnú terapiu. Poruchy kostného metabolizmu nie sú zďaleka len problémom pacientov s myelómom.

Veľmi dôležitou oblasťou pre potenciálne vyliečiteľných mladých pacientov je fertilita. Snaha o zachovanie fertility využíva výber menej toxických režimov, hormonálne manipulácie a uchovávanie zárodočných buniek a tkanív. S rozvojom a dostupnosťou reprodukčnej medicíny pribúda možností riešenia aj pre našich pacientov [7].

Pacienti po liečbe hematologických malignít majú často perzistentný imunodeficit s následkami – vyšším rizikom infekcií, pričom sú často spôsobené aj patogénmi, proti ktorým sa dá efektívne očkovať. V porovnaní s pacientami s nehematologickými nádormi sú napríklad

pacienti s DLBCL zaťažení vyššou incidenciou vírusových a mykotických pneumónií, meningitíd a celkovo humorálneho deficitu [8]. Vakcinačné programy s odporúčanými schémami sú vhodným prostriedkom na zníženie infekčnej morbidita a mortality. Špecifická vakcinácia hematologických pacientov po liečbe sú, aj vďaka súčasnej pandemickej ére viac známe.

Špecifická orgánová toxicita máva rozmanitý obraz – od spočiatku klinicky nemej nefropatie alebo hepatopatie až po závažné prejavy zlyhávania orgánov; výskyt neuropatie a chronickej bolesti býva asociovaný s výrazným zhoršením kvality života.

Psychické následky po náročnej protinádorovej liečbe sú nezriedka podceňované a aj ich komunikácia samotnými pacientami nebýva dominantná v rámci stretnutia s ošetrovateľom. Chronická únava a kognitívne poruchy bývajú často limitujúcimi prvkami celkového stavu a pocitu zdravia prežívajúceho pacienta.

Je zjavné, že široké spektrum ťažkostí našich prežívajúcich pacientov vyžaduje individuálny prístup na pozadí rámčového programu dlhodobého sledovania. Preto sa viaceré odborné spoločnosti venujú tejto problematike a výsledkom sú viaceré odporúčané postupy, ktoré aktívne preberajú a využívajú pacientske organizácie a podporné skupiny.

Ustanovenie kvalitných programov na sledovanie dlhodobo prežívajúcich pacientov je aktuálnou výzvou nielen pre hematologickú/onkologickú obec, vyžaduje multidisciplinárny prístup, vypracované algoritmy ale aj ľudské zdroje. Je potrebné si uvedomiť, že ide o komplexný problém a jedna intervencia nemusí ovplyvniť všetky následky. Cesta ovplyvnenia neskoršej kvality života pacienta začína v čase plánovania terapeutického postupu všeobecnými alebo špecifickými intervenciami. Všeobecné zahŕňajú redukciu celkových dávok chemoterapie (bez ovplyvnenia účinnosti), menej alkylačných látok, redukcia dávok a zmenšenie ožarovaných polí, straté-



gia adaptovanej terapie (interim PET/CT pri HL). Špecifické intervencie sú zamerané na jednotlivé problémy – prevencia a skrining sekundárnych malignít; kardio a pľúcne surveillance; zachovanie fertility; prevencia infekčných komplikácií, psychologické intervencie a sociálna pomoc. Jednoduché dotazníky kvality života – napríklad EORTC QLQ-30 sú významnou pomôckou v hodnotení.

V prípade rozhodnutia vybudovať kvalitný program starostlivosti o prežívajúcich hematoonkologických pacientov existujú viaceré príklady, ktoré možno použiť a sú dostupné na webe [4,9]. Základné modely sú:

1. centralizované na špecializovaných pracoviskách (ambulanciách), zvyčajne v centre, kde prebiehala protinádorová liečba; dobrým príkladom môžu byť niektoré transplantáčne pracoviská;
2. decentralizované na regionálnych pracoviskách alebo v ambulanciách praktikov (po ukončení liečby v špecializovanom centre);
3. zmiešaný model.

Vhodným modelom sa javí vytvorenie „Observačnej kliniky“, ktorý však vyžaduje optimálne personálne, materiálne a priestorové obsadenie potrebnými špecializáciami. Na Slovensku takýto model t.č. nie je dostupný, hematologické centrá využívajú rôzne spôsoby následnej starostlivosti. Pri budovaní programov pre prežívajúcich pacientov po liečbe alebo na prebiehajúcej liečbe (myslíme aj na chronické hematologické malignity) je treba byť orientovaný na pacienta a jeho potreby, preto je spolupráca s pacientskými organizáciami vítaná a potrebná.

V ére rastúcich terapeutických možností dostupných pre pacientov s hematologickými malignitami bude narastať počet prežívajúcich pacientov. Integrácia programov dlhodobého sledovania do štandardného plánu starostlivosti je správny krok.

#### Literatura

1. Kremer LC, Mulder RL, Oeffinger KC, et al. International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. A worldwide collaboration to harmonize guidelines for the long-term follow-up of childhood and young

adult cancer survivors: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(4):543–549.

2. Dore GM, Curtis RE, Dalal NH et al. Cause-specific mortality following initial chemotherapy in a population-based cohort of patients with classical Hodgkin lymphoma, 2000–2016. *J Clin Oncol* 2020; 38(35):4149–4162.

3. Mladosičová B, Rečková M. Neskoré následky protinádorovej liečby. *Onkologia (Bratisl.)* 2015;10(3):140–146.

4. ESMO guidelines, <https://www.esmo.org/for-patients/patient-guides/survivorship> (dostupné 02.06.2021).

5. Schaapveld M, Aleman BM, van Eggermond AM et al. Second cancer risk up to 40 years after treatment of Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;373(26):2499–2511.

6. Armenian SH, Lacchetti C, Barac A et al. Prevention and monitoring of cardiac dysfunction in survivors of adult cancers: ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2017;35(8):893–911.

7. Salama M, Anazodo A, Woodruff TK. Preserving fertility in female patients with hematological malignancies: a multidisciplinary oncofertility approach. *Ann Oncol*. 2019;30(11):1760–1775.

8. Shree T, Li Q, Glaser SL et al. Impaired immune health in survivors of diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2020;38(15):1664–1675.

9. NCCN guidelines; [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/survivorship.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/survivorship.pdf) (dostupné 09.06.2021).

## Periferně zaváděné centrální katetry (PICC) u hematologických nemocných

Szotkowski T.

za PICC tým HOK FN Olomouc

Zajištění bezpečného a stabilního přístupu do centrálního žilního systému je nezbytnou součástí podpůrné péče o významnou část hemato-onkologických nemocných. Umožňuje jak opakované odběry krve, tak především opakovanou aplikaci řady léků a léčivých přípravků, jejichž chemické a/nebo biologické vlastnosti neumožňují bezpečné podání prostřednictvím periferních žil.

Periferně zaváděné centrální katetry (*peripherally inserted central catheter* – PICC) patří k dostupným prostředkům

zajišťujícím především střednědobý přístup (3–6 měsíců) do centrální žíly pro nemocné v řadě lékařských oborů. K nejčastějším indikacím zavedení PICC patří plánovaná protinádorová léčba. Další využití tyto katetry nachází například u nemocných vyžadujících dlouhodobou (domácí) parenterální výživu, u těžších forem některých chronických onemocnění s nutností opakované nitrožilní léčby, např. astma bronchiale či epilepsie. Umožňují také opakované nitrožilní aplikace u nemocných s insuficientním

periferním žilním systémem v ambulantním režimu. Frekvence jejich využití v posledních letech významně narůstá v řadě vyspělých zemí vč. České republiky.

Podmínkou pro plné využívání možností PICC je správný způsob zavádění a především pak pravidelného ošetřování. Obojí je obvykle realizováno v režii vyškoleného PICC-týmu, který je schopen řešit i komplikace související s těmito katetry. Výhodou pro tým a zejména pacienty jsou možnost, schopnost a zkušenosti s implantacemi také dalších

prostředků zajišťujících iv. vstupy, jako jsou různé varianty centrálně zaváděných centrálních katetrů, midline katetry, žilní porty či PICC-porty. Díky tomu je pak možné individuálně vybrat optimální variantu žilního vstupu „šitou na míru“ pacientovi, jeho preferencím, anatomickým poměrům, léčenému onemocnění, konkrétnímu typu léčby a řadě dalších faktorů.

Hemato-onkologická onemocnění jsou často spojována s vyšším rizikem infekč-

ních, krvácivých i trombotických komplikací cévních vstupů než jiné nemoci, jejichž léčba vyžaduje použití žilního katetru. Tyto komplikace mohou souviset s často se vyskytujícími trombopenií, neutropenií a koagulopatií a týkají se jak procedury zavádění těchto vstupů, tak i jejich používání. Přesto je podle zkušeností autorů tohoto sdělení využití PICC u hematologických nemocných bezpečným prostředkem k zajištění i dlouhodobého (> 6 měsíců) žilního přístupu.

Naše zkušenosti s využitím PICC u nemocných s akutní leukémií jsou popsány v recentně přijaté původní práci v časopise Hematologie a transfuze dnes. Další zkušenosti, výsledky a vybraná specifika využití PICC v hematonekologii budou obsahem prezentace.

#### **Grantová podpora**

Práce byla podpořena granty IGA\_LF\_2021\_001 a MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).

## Přehled buněčné terapie v kontextu i mimo kontext HSCT

Lysák D.

Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň

Buněčná terapie zažívá v posledních letech obrovský rozvoj, který se dotýká zejména protinádorové imunoterapie, ale i jiných oblastí medicíny. Umožňuje nám léčit a potenciálně i vyléčit pacienty se život ohrožujícími relabujícími a refrakterními hematologickými malignitami. Tento vývoj byl umožněn mimo jiné díky zkušenostem získaným při provádění transplantací hemopoetických kmenových buněk (HSCT), a to jak z pohledu efektivity, tak bezpečnosti. Schopnost transplantovaného imunitního systému kontrolovat reziduální nádorovou populaci je hlavní výhodou alogenní transplantace, která snižuje riziko relapsu v porovnání s autologním nebo netransplantačním přístupem.

Alogenní HSCT představuje platformu, na které je možné aplikovat další metody buněčné terapie, které umožňují řešit některé potransplantační komplikace. Úspěšná transplantace spočívá nejen v regeneraci hematopoetického a imunitního systému, ale zejména v úspěšném zvládnutí imunologických interakcí a prevenci relapsu nádorového onemocnění. Imunokompetentní buňky dárce mohou poškozovat tkáň příjemce, způsobovat reakci štěpu proti hostiteli (GVHD) a zároveň díky reakci štěpu proti leukémii (GVL) eliminovat nádorové buňky. Alogenní HSCT je také spojena s opožděnou imunitní rekonstitucí, která představuje riziko infekčních komplikací pro příjemce.

Samotná alogenní transplantace je díky GVL efektu vlastně imunoterapií. Schopnosti imunitního systému dárce kontrolovat nádorové onemocnění se využívá při léčbě relapsů infuzemi lymfocytů dárce (DLI). Jedná se o nespecifickou buněčnou imunoterapii aplikovanou zpravidla v režimu eskalujících

dávek pro udržení nízkého rizika GVHD, jejíž efektivita je dána zejména typem nádoru. Větší pravděpodobnost odpovědi lze předpokládat u chronických lymfoidních neoplazií (až 80 %) než u myeloidních malignit typu AML/MDS (20–30 %) [1].

Buněčná terapie může pomoci v prevenci či léčbě potransplantačních komplikací, které jsou také častými důvody selhání transplantační léčby a úmrtí pacienta, tedy zejména relapsu nádorového onemocnění, GVHD a infekcí. Může se jednat o zvýšení imunologické tolerance a léčbu reakce štěpu proti hostiteli anebo naopak o posílení reakce štěpu proti leukémii při prevenci či léčbě relapsu. Postupy buněčné terapie lze využít i pro urychlení regenerace protiinfekční imunity.

Riziko vzniku GVHD je dáno mimo jiné množstvím T-lymfocytů podaných při transplantaci. Aktuálně je většina transplantátů minimálně manipulovaných a dávka lymfocytů v nich není nijak ovlivňována. Prevence GVHD úpravou transplantátu přichází do úvahy zejména u haploidentických, případně nepříbuzenských transplantací. Kompletní deplece lymfocytů např. pomocí CD34+ selekce či CD3+/19+ deplece může sice snížit riziko GVHD, bohužel ale za cenu opožděné imunitní rekonstituce a zvýšeného výskytu relapsů. Hledají se proto postupy s cílenou manipulací definovaných T-buněčných populací, které by umožnily lepší kontrolu jejich aktivity in vivo, a tedy lepší prevenci GVHD. Využívají se metody selekce specifických T-subpopulací, jako jsou CD8+, TCR $\alpha\beta$ +/CD19+ deplece nebo deplece naivních T-lymfocytů (CD45RA+), s cílem omezit aloreaktivní odpověď, ale zachovat NK buňky a další buněčné subtypy,

a usnadnit tak imunitní rekonstituci po transplantaci.

Pokud již dojde ke vzniku klinicky závažné GVHD, a to zejména resistantní na konvenční immunosupresivní léčbu, mohou se uplatnit další metody buněčné terapie, zejména regulační T-lymfocyty (Tregs) nebo mesechymální stromální buňky (MSCs).

MSCs se více než profylakticky používají v léčbě již rozvinuté GVHD. Řada studií potvrdila jejich efektivitu s cca 40–60 % odpovědí, zejména u akutní GVHD [2], přestože statistické významnosti bylo ve studiích dosaženo jen zřídka, což může být ovšem dáno řadou faktorů (komplexní patofyziologie GVHD, různé dávky a dávkovací schémata, předléčení immunosupresí atd.). Zpravidla se jedná o alogenní MSCs získané z kostní dřeně zdravých dárců. Pro dosažení optimálního efektu jsou důležité opakované aplikace a roli hraje také časový faktor, kdy pacienti, u nichž jsou MSC aplikovány časně po zahájení kortikosteroidů (1–2 týdny), mají vyšší naději na dosažení kompletní remise akutní GVHD proti pacientům s pozdější aplikací. Zároveň nemocní s odpovědí na terapii MSC mají nižší nerelapsovou mortalitu a lepší přežití. Přestože se jedná o alogenní přípravek, není terapie MSCs zatížena žádnou akutní infuzní toxicitou a ani nebyly zjištěny dlouhodobé komplikace ve smyslu aktivace GVHD či vlivu na relaps [3]. V řadě center je proto v současné době MSCs terapie považována za standardní součást léčby steroidně refrakterní GVHD.

Mechanismus účinku MSCs nespočívá v přímé mezibuněčné interakci, ale spíše v produkci protizánětlivých cytokinů a molekul (IDO, PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$ , IL-6) a také v uvolnění extracelulárních ve-

zikul (EVs) s obsahem bioaktivních molekul včetně miRNA. EVs získané z mesenchymálních kmenových buněk (MSC-EVs) jsou schopné modulovat aktivitu T- i B- lymfocytů, snižují jejich proliferaci a diferenciaci do efektorového fenotypu, zatímco zachovávají regulační T-lymfocyty. Imunomodulační efekt EVs byl prokázán v řadě experimentálních modelů GVHD, kde byl pozorován příznivý vliv na omezení projevů jak akutní, tak chronické GVHD. Imunomodulační potenciál a nízká imunogenicita MSC-EVs je předurčující k léčbě potransplantačních komplikací. Cirkulující EVs, jejich množství a složení, jsou využitelné také jako biomarkery vzniku GVHD. Vezikuly lze připravit také z jiných typů buněk. EVs derivované z NK buněk zdravých dárců (NK-EVs) mají slibný protinádorový efekt v preklinických studiích. Obsahují cytotoxické proteiny (perforin, granzyme) schopné ničit nádorové buňky. EVs z dendritických buněk (DC-EVs) nesou všechny molekuly nutné pro aktivaci T-buněčné odpovědi (MHC a kostimulační molekuly) [4].

Regulační T-lymfocyty (Tregs) mají oproti MSCs a MSC-EVs dlouhodobý status „vysokého potenciálu“, ale jejich klinické využití se teprve rozvíjí. Tregs jsou schopné navodit imunologickou toleranci a lze je teoreticky využít v prevenci i léčbě GVHD. Je popsána asociace mezi deficiencí Tregs a GVHD. Optimální způsob podání expandovaných Tregs po transplantaci však není zatím jasný a probíhající studie musí teprve upřesnit jejich roli v managementu GVHD [5].

Relativně novou možností ovlivnění GVHD představují invariantní NKT buňky (iNKT). Jde o vzácnou subpopulaci lymfocytů s důležitou rolí v imunitní regulaci. Invariantní iNKT lymfocyty interagují s ostatními imunitními elementy a uplatňují se u mnoha typů patologických stavů, včetně zánětlivých onemocnění. Studie dokládající jejich důležitost pro patofyziologii GVHD. Nízké množství iNKT ve štěpu či nízká hladina v periferní krvi po alogenní HSCT je spojena s vyšším rizikem vzniku GVHD [6]. Invariantní

NKT redukuje riziko vzniku GVHD v časném potransplantačním období v experimentálních modelech, aniž by snižovaly GVT efekt. iNKT buňky expandované *in vivo* v přítomnosti  $\alpha$ -galactosylceramidu navíc samy vykazují přímou protinádorovou aktivitu, a podporují tak GVL efekt. Dostatečná humánní data však zatím chybí a klinická efektivita iNKT v kontrole či prevenci GVHD není ještě stanovena.

Eliminace leukemických buněk při alogenní transplantaci je umožněna rozeznáním nádorově specifických antigenů, minor histokompatibilních antigenů (mHAg) a/nebo neshodných HLA antigenů imunitními buňkami dárce. V případě HLA shodných příbuzenských transplantací se uplatní právě mHAg, zatímco u transplantací s nepříbuznými dárči se cílem aloreaktivních buněk mohou stát vedle mHAg také neshodné HLA antigeny. Téměř 80 % transplantací zahrnuje mHA neshodu, některé z nich jsou omezené na hematopoetický systém a mohou zprostředkovat silný anti-leukemický efekt. HLA-DPB1 neshoda je přítomná minimálně u 80 % nepříbuzenských transplantací a aloreaktivní odpověď vyvolává jak GVL, tak GVHD efekt. Na základě znalostí polymorfizmů regulujících HLA-DP expresi jsou preferovány některé typy neshod vyvolávající omezenou T-aloreaktivitu, která poskytuje GVL efekt, aniž by zvyšovala riziko GVHD. Tyto tzv. permissivní neshody se standardně využívají v rámci procesu výběru nejvhodnějšího dárce. Jak mHAg, tak HLA-DP představují vedle nádorově specifických antigenů vhodné cíle pro buněčnou imunoterapii.

Metody buněčné terapie umožňují připravovat pro danou leukémii specifické buněčné produkty, které mohou řešit omezenou aloreaktivní aktivitu danou např. ztrátou cílových HLA molekul, která může vyústit v relaps onemocnění. Infuze T-lymfocytů reagujících na nádorové antigeny jako WT1 či bcr-abl vykazují proti-leukemickou aktivitu u AML, resp. ALL [1]. Jejich klinická efektivita je výrazně spojena s dostatečnou *in vivo* perzistencí těchto buněk.

Proti-leukemickou aktivitu mají také NK buňky, které jsou součástí přirozené imunitní odpovědi. Nenesou specifické receptory jako T-lymfocyty a jejich schopnost rozpoznat patologické buňky je dána rovnováhou aktivačních a inhibičních receptorů. NK buňky představují první lymfoidní populaci, která se rekonstituuje po transplantaci. Pacienti s AML transplantovaní se štěpy obsahujícími aloreaktivní NK buňky mají nižší riziko relapsu a časná obnova NK buněk ovlivňuje příznivě výsledek HSCT. Funkce NK buněk je negativně regulována inhibičními KIR receptory pro MHC I molekuly na cílových buňkách. Při alogenní transplantaci (haploidentické, s nepříbuzným dárce) umožňuje inkompatibilita KIR ligandů aloreaktivitu NK buněk a lepší transplantační výsledky ve smyslu snížení frekvence relapsů i GVHD. Zatímco snížení MHC I exprese na nádorových buňkách omezuje jejich viditelnost pro cytotoxické T-lymfocyty, může zároveň posilovat jejich vnímavost k lýze zprostředkované NK buňkami, která je dále akcentována rozpoznáváním stresových signálů aktivačními receptory (jako NKG2D).

Alogenní i autologní NK buňky mohou být také expandovány a aktivovány *in vitro* pro jejich využití v adoptivní imunoterapii. Největší zkušenosti jsou k dispozici na souborech haploidentických transplantací, kde byla prokázána funkční proti-leukemická aktivita u vysoce rizikových AML. Ověřují se také kombinace (autologních) NK buněk s monoklonálními protilátkami, které po vazbě na cílový nádorový antigen zvyšují funkci NK buněk zprostředkovanou Fc receptorem (např. anti-CD20) [7].

Protinádorově zaměřená buněčná terapie se ale odehrává i mimo kontext alogenní transplantace. Jako nejslibnější se ukázala být genetická modifikace umožňující připravit klinicky relevantní množství T-lymfocytů exprimujících chimerický antigenní receptor (CAR) nebo nádorově specifický  $\alpha\beta$  T-buněčný receptor (TCR). Zejména autologní CAR-T produkty zažívají obrovský boom v ob-

lasti léčby B-lymfoidních neoplazií. Optimální integrace CAR-T terapie a alogenní transplantace se bude teprve upřesňovat. Obě metody nabízejí dlouhodobou remisi u jinak obtížně vyléčitelných onemocnění. Využití nespecifické aloreaktivity a GVL efektu u alo HSCT kontrastuje s cíleným charakterem geneticky modifikovaných CAR-T buněk. Budoucnost ukáže, jaká bude jejich vzájemná koexistence, a která metoda bude případně dominovat, a to v závislosti na vývoji efektivity, toxicity, lokálních zvyklostí atd. Oba přístupy se budou pravděpodobně doplňovat a zčásti si konkurovat.

CAR-T terapie u pacientů po alogenní HSCT obnáší aplikaci lymfocytů pocházejících z transplantovaného imunitního systému. Zatímco využití DLI u pacientů relabujících po transplantaci je zatíženo rizikem vzniku GVHD (cca 45 %), po-transplantační podání CAR-T je spojeno s minimálním rizikem aktivace GVHD, a to i přes jejich „alogenní“ původ. Vedlejší účinky léčby vč. cytokinového syndromu či neurotoxicity nejsou předchozí transplantací zvýšené a alogenní procedura pravděpodobně neovlivňuje bezpečnost ani efektivitu následné CAR-T terapie [8]. CAR-T terapie může být zvažována již před alogenní HSCT k ovlivnění reziduální nemoci, avšak s vědomím, že většina modifikovaných buněk bude odstraněna conditioningem a cílený protinádorový efekt daný perzistencí CAR-T buněk bude nahrazen nespecifickým GVL efektem. Nebo ji lze využít v potransplantačním období k plánované konsolidaci remise nebo jako postup pro řešení progresse onemocnění.

Klinická rozhodnutí, jak nejlépe skloubit CAR-T terapii a transplantaci a jaká je optimální sekvence obou přístupů, nelze bohužel u řady onemocnění opřít o dostatečná data. V případě R/R ALL může být CD19 CAR-T terapie zvažována před transplantací k navození (MRD negativní) remise nebo po transplantaci při relapsu onemocnění. Neexistuje jasný konsenzus a jde o individuální rozhodnutí. Nedostatečná perzistence CAR

buněk nebo odeznění B-buněčné aplazie mohou být indikátory pro zvážení alogenní transplantace, přestože neupozorňují nijak na CD19 negativní relapsy. Každopádně je vhodné u B-ALL pacientů být na potřebu alogenní HSCT připraven. Pacienti R/R DLBCL mohou při CAR-T terapii dosáhnout min. 40 % dlouhodobých kompletních remisí. Efektivita léčby je srovnatelná nebo lepší v porovnání s alogenní transplantací, navíc s lépe řešitelnou a časově omezenou toxicitou. CAR-T v podstatě nahradila transplantaci v léčbě opakovaně relabujícího DLBCL. K alogenní transplantaci mohou být teoreticky zvažováni pacienti s vysokým rizikem relapsu po CAR-T (SD), ale obecně je konsolidace transplantací u NHL pacientů s odpovědí na CAR-T terapii na rozdíl od B-ALL sporná. BCMA (B-cell maturation antigen) CAR-T představují slibnou metodu léčby mnohočetného myelomu. Způsob jejich ideálního začlenění do léčebných protokolů stejně jako dlouhodobá efektivita zatím nejsou jasné, nicméně existuje šance, že by mohly v budoucnu nahradit alogenní transplantaci v této indikaci. V případě myeloidních malignit, které jsou nejčastější indikací k alogenní transplantaci, zůstává problémem volba vhodného cílového antigenu, které jsou nezářídka exprimovány i na hematopoetických buňkách nebo i jiných tkáních (např. CD123 na endotelu). Ověřuje se řada postupů, jak zvýšit specifitu CAR-T terapie u AML (jako CAR-T s duální specifitou atd.). Pro dosažení co nejlepší odpovědi bude pravděpodobně vhodná kombinace obou přístupů, tedy buněčné terapie a transplantace.

Použití „univerzálních“ alogenních CAR-T (UCAR-T) by umožnilo odstranit některé nevýhody autologních produktů (nízká kvalita vstupního biologického materiálu, čas nutný na výrobu atd.) a nabídnout léčbu v krátkém časovém horizontu (*off-the-shelf*). Metoda bohužel naráží na jiné specifické problémy jako je riziko GVHD dané aloreaktivitou UCAR-T či omezená perzistence in vivo způsobená činností pa-

cientových T- a NK buněk. Řada studií se snaží odstranit tyto nevýhody genetickým editováním zasahujícím do exprese T-buněčného receptoru s cílem vytvořit skutečně univerzální CAR-T produkt.

Geneticky modifikovat je možné také NK buňky a NK-CAR produkty mají oproti CAR T-lymfocytům některé výhody, zejména menší výskyt komplikací (cytokinový syndrom, neurotoxicita). Zároveň není jejich efekt závislý jen na CAR receptoru, ale díky přirozené cytotoxické aktivitě mohou zůstat částečně funkční i při downregulaci cílového nádorového antigenu.

Buněčná terapie nachází využití také při prevenci a léčbě infekčních komplikací spojených s transplantací. Po alogenní transplantaci je velkým problémem opožděná imunitní rekonstituce, a to zejména při haploidentické transplantaci či transplantaci s T-deplecí štěpu. Imunitní rekonstituce je ovlivněna řadou peri-transplantačních parametrů (typ předchozí léčby a přípravy, typ štěpu atd.) a významný vliv má také GVHD a její prevence i léčba. Transplantovaní pacienti jsou ohroženi nejen reaktivací herpetických infekcí (CMV, EBV), ale mají oslabenou odpověď i proti oportunním infekcím, virovým (adenovirus) i mykotickým (aspergillus). Navzdory pokrokům v profylaktické a pre-emptivní farmakoterapii je tato léčba omezena toxicitou (myelo-, nefrotoxicita) a v některých případech nedostatečnou účinností.

Imunoterapeutické postupy se snaží posílit protiinfekční imunitní rekonstituci a současně nezvyšovat riziko GVHD. Adoptivní přenos virus specifických T-lymfocytů (VSTs) může být založen na jejich přímé izolaci z aferetického produktu dárce, např. pomocí interferon- $\gamma$  sekreční metody. Takto lze připravit lymfocyty proti různým virovým peptidům a díky obsahu CD4+ i CD8+ frakce dosáhnout jejich dlouhodobého působení. Virově specifické T-lymfocyty lze vyrobit ve větších množstvích také in vitro kultivací a stimulací virovými antigeny. V rámci jednoho vy-

robního procesu je dokonce možné připravit multi-specifické protivirové lymfocyty namířené proti několika patogenům současně (CMV, EBV, adenovirus apod.), a tím zkrátit laboratorní přípravu i celou imunoterapeutickou intervenci. Efektivita léčby pomocí VSTs je přes heterogenitu dostupných studií velmi nadějná a dosahuje 60–80 % [9]. Tuto buněčnou terapii je ovšem nutné připravit pro každého pacienta individuálně, což její využití do určité míry limituje. Předpokladem je také relativně nízká hladina imunosuprese, protože zejména vyšší dávky kortikosteroidů mohou potlačovat protivirovou aktivitu lymfocytů. Dalším omezením může být nedostupnost dárců, kteří nejsou patogen naivní a jsou využitelní pro izolaci patogen specifických lymfocytů. Možným řešením je léčba pomocí tzv. „third-party“ virové specifických T-lymfocytů, které jsou získány od jiných dárců, než jsou dárci původních kmenových buněk, a které jsou okamžitě k dispozici jako „off-the-shelf“ produkty. Banky uchovávající lymfocyty s definovanou virovou specifikou a HLA fenotypem by pak umožnily výběr nejlepšího VSTs produktu pro daného pacienta. Protože jsou tyto lymfocyty pouze částečně HLA shodné s příjemcem, nepřetrvávají po aplikaci dlouho-

době, nicméně dostatečně dlouho na to, aby podpořily potransplantační imunitní rekonstrukci [10].

Buněčné terapie patří mezi nejzajímavější inovace v medicíně v posledním desetiletí a má potenciál nabídnout řešení pro řadu život ohrožujících, zejména nádorových, onemocnění. Rychlý vývoj v této oblasti je umožněn kombinací pokroku v biotechnologii a lepších znalostí nádorové biologie a biologických mechanismů, které jsou základem účinnosti a bezpečnosti imunoterapie. Buněčná terapie zároveň představuje dynamické prostředí, které se velmi rychle vyvíjí a přináší řadu legislativních i medicínských nejistot. Zároveň lze očekávat, že celkové počty pacientů léčených buněčnou či genovou terapií porostou v dalších 5–10 letech exponenciálně a že tyto terapie z části nahradí transplantace krvetočných buněk.

#### Grantová podpora

Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPI, 00669806), grantem MZ 15-30661A a grantem Nadace pro transplantaci kostní dřeně.

#### Literatura

1. Chabannon C, Kuball J, Bondanza A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. *Sci Transl Med.* 2018;10:eaap9630.

2. Dalowski F, Kramer M, Wermke M, et al. Mesenchymal stromal cells for treatment of acute steroid-refractory graft versus host disease: Clinical responses and long-term outcome. *Stem Cells.* 2016;34:357–366.

3. Fisher SA, Cutler A, Doree C, et al. Mesenchymal stromal cells as treatment or prophylaxis for acute or chronic graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients with a haematological condition. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;1:CD009768.

4. Lia G, Di Vito C, Cerrano M, et al. Extracellular vesicles after allogeneic hematopoietic cell transplantation: emerging role in post-transplant complications. *Front Immunol.* 2020;11:422.

5. Zahid MF, Lazarus HM, Ringdén O, et al. Can we prevent or treat graft-versus-host disease with cellular-therapy? *Blood Reviews.* 2020;43:100669.

6. Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, et al. Recovery of  $V\alpha 24+$  NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34:595–602.

7. Tanaka J, Miller JS. Recent progress in and challenges in cellular therapy using NK cells for hematological malignancies. *Blood Reviews.* 2020;44:100678.

8. Appelbaum JS, Milano F. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Era of Engineered Cell Therapy. *Current Hematologic Malignancy Reports.* 2018;13:484–493.

9. Basso S, Compagno F, Zelini P, et al. Harnessing T Cells to control infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2020;11:567531.

10. O'Reilly RJ, Prockop S, Hasan AN, et al. Virus-specific T-cell banks for 'off the shelf' adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:1163–1172.

## CAR-T léčba ve světě a v ČR

Pytlík R.<sup>1,2</sup>, Folber F.<sup>3</sup>, Šrámková L.<sup>4</sup>, Polgárová K.<sup>2</sup>, Šrámek J.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Oddělení buněčné terapie, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

<sup>2</sup> 1. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

<sup>3</sup> Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

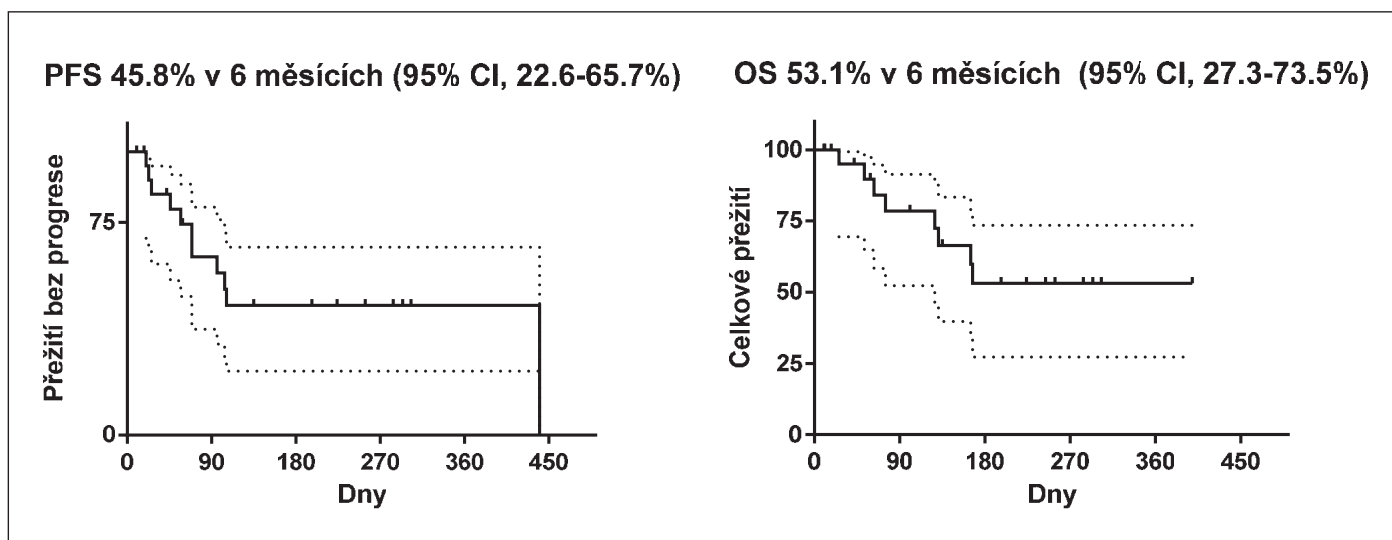
<sup>4</sup> Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>5</sup> Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň

Léčba T-lymfocyty s chimérickými antigenními receptory (CAR-T) se úspěšně zařadila mezi léčebné metody hematologických malignit. Chimérické receptory druhé generace umožnily obejít klasický systém antigenní prezentace

pomocí T-buněčných receptorů v kontextu HLA molekul a navíc jejich kostimulační složka při styku s nádorovými buňkami aktivuje proliferaci a efektorové funkce CAR-T-lymfocytů. Léčba CAR-T lymfocyty je spojena s unikátními

toxicitami – syndromem z uvolnění cytokinů (CRS) a neurotoxitou (ICANS), frekvence těchto toxicit se liší v závislosti na použitém přípravku a léčeném onemocnění. Vzhledem k tomu, že před infuzí CAR-T probíhá lymfodepleční



**Obr. 1. Přežití bez progresce a celkové přežití u 23 pacientů z ČR s relabovanými a refrakterními B-lymfomy léčených v ČR preparátem tisa-cel. Medián sledování je 6,5 měsíce pro žijící nemocné.**

chemoterapie, jsou časté i cytopenie a infekce [1].

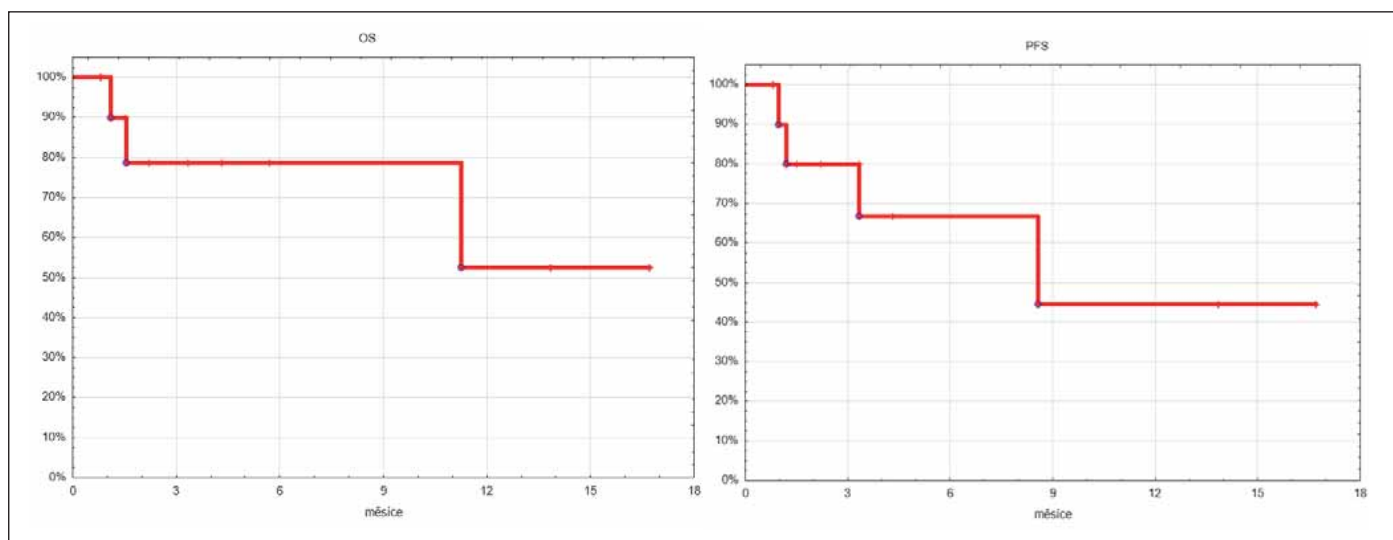
V tomto přehledu se budeme věnovat zahraničním i českým zkušenostem s komerčně dostupnými preparáty a výhledům do bezprostřední budoucnosti. V Evropské unii jsou v současné době schválené dva preparáty (axi-cel a tisa-cel) pro léčbu relabovaných a refrakterních (R/R) agresivních B-lymfomů po dvou a více předchozích liniích terapie. Oba tyto preparáty mají anti-CD19 specificitu a používají identický vazebný fragment (myší FMC63 ScFv). Třetí preparát (liso-cel) je v obdobných indikacích schválen v USA. Od předchozích dvou přípravků se liší zejména tím, že se jedná o fixní směs CD4 a CD8 buněk v poměru 1 : 1, čemuž je přičítána nižší frekvence závažných nežádoucích účinků. Přímá srovnání efektivity uvedených tří preparátů jsou obtížná vzhledem k rozdílnému designu registračních klinických studií. Celkové odpovědi na léčbu (ORR) je dosahováno v 50–80 %, kompletní remise (CR) v 40–60 % případů a přežití bez progresce v jednom roce (PFS) u 30–40 % pacientů. Vzhledem k tvorbě plateau na křivkách přežití je možno očekávat, že významná část pacientů, kteří dosáhli kompletní remise, je vyléčena. Bez problémů není ani srovnání toxicity preparátů, vzhledem k používání odlišných kritérií pro CRS v jednotlivých studiích.

Celkem lze ale říci, že CRS i ICANS jsou nejčastější (i kdy ne nutně nejtěžší) při léčbě axi-celem a s ohledem k toxicitě je nutné s tímto přípravkem postupovat opatrně zejména u starších nemocných. V současné době existuje řada dat z velkých center i z patientských registrů dokazující, že výsledky v běžné populaci pacientů jsou u těchto přípravků srovnatelné s výsledky klinických studií [5].

V České republice bylo do dubna 2021 léčeno celkem 23 pacientů s R/R agresivními B-lymfomy přípravkem tisa-cel ve třech centrech (ÚHKT, FN Brno, VFN Praha). Věkový medián byl 63 let (33–76), 61 % pacientů bylo k CAR-T indikováno po selhání 3 a více předchozích liniích léčby. K datu analýzy bylo pro léčebnou odpověď hodnotitelných 18 nemocných, ORR byla 56 % CR 44 %. Celkové přežití (OS) – 53 % a PFS 46 % v 6 měsících celkem přesně odpovídá výsledkům registrační studie JULIET (obr. 1). Celkem 70 % pacientů mělo CRS, ale pouze 13 % grade 3, grade 4–5 toxicitu jsme nepozorovali. Pouze 17 % pacientů mělo lehkou formu neurotoxicity (grade 1). Ve stejném období bylo v jednom centru (FN Brno) indikováno 16 pacientů pro léčbu přípravkem axi-cel. Věkový medián byl 53 let (29–71), medián předchozích linií léčby byl 3 (2–5). Celkem 11 nemocných (z toho 7 PMBL) bylo léčeno a 9 z nich bylo hodnotitel-

ných pro léčebnou odpověď. Čtyři nemocní měli jako nejlepší odpověď CR a 2 parciální remise (67 % ORR). Přežití bez selhání léčby bylo 67 % v 6 a 44 % ve 12 měsících (obr. 2). Údaje pro Českou republiku budou aktualizovány k době konání hematologického sjezdu vč. zahrnutí výsledků dalšího CAR-T centra ve FN Plzeň.

Přípravek tisa-cel je schválen v EU též pro léčbu relabovaných/refrakterních akutních B-lymfoblastových leukémií (ALL) u pacientů do 25 let. V registrační studii ELIANA dosáhlo CR či CR s inkompletní regenerací krevního obrazu (CRi) vč. eliminace minimální reziduální nemoci (MRN) celkem 81 % nemocných, všichni měli i molekulární odpověď. Na rozdíl od ne Hodgkinsonských lymfomů však u pacientů s léčebnou odpovědí byly časté relapsy – přežití bez události (EFS) bylo 73 % v 6 měsících a 50 % ve 12 měsících. CRS i ICANS byly častější než u pacientů léčených stejným preparátem pro agresivní B-lymfomy (celkem 77 % a 40 %, těžkých 47 %, resp. 13 %). Regenerace normálních B lymfocytů predikovala i relaps maligního onemocnění. V ČR bylo do dubna léčeno celkem 7 nemocných (4 pediatričtí a 3 mladí dospělí) ve 3 centrech (FN Motol Praha, ÚHKT Praha a FN Brno). Při jednom časném úmrtí dosáhlo ostatních 6 pacientů kompletní remise včetně negativita na



Obr. 2. Přežití bez progresu a celkové přežití u 11 pacientů s relabovanými a refrakterními B-lymfomy léčených v ČR preparátem axi-cel.

Tab. 1. Vybrané klinické studie Pokročilejší fáze klinických studií s CAR-T lymfocyty.

Studie	Fáze	Produkt	Indikace
<b>NHL</b>			
ZUMA-7 (NCT03391466)	III	Axi-cel	2. linie R/R agresivní B-NHL versus SoC
TRANSFORM (NCT03575351)	III	Liso-cel	2. linie R/R agresivní B-NHL versus SoC
BELINDA (NCT03624036)	III	Tisa-cel	2. linie R/R agresivní B-NHL versus SoC
ZUMA-12 (NCT03761056)	II	Axi-cel	Agresivní rizikové B-NHL PET+ po léčbě 2 cykly léčby 1. linie
ZUMA-5 (NCT03105336)	II	Axi-cel	R/R indolentní B-NHL
ELARA (NCT03568461)	II	Tisa-cel	R/R folikulární lymfom
ZUMA-8 (NCT03624036)	I/II	Brexu-cel	R/R CLL
<b>ALL</b>			
ZUMA-4 (NCT02625480)	I/II	Axi-cel	R/R ALL nebo B-NHL u pediatrických pacientů
CASSIOPEIA (NCT03876769)	II	Tisa-cel	ALL MRD+ po léčbě 1. linie u pediatrických pacientů a mladších dospělých
<b>Mnohočetný myelom</b>			
KarMMa-3 (NCT03651128)	III	Ide-cel	Fáze III R/R MM (po 2–4 liniích léčby) v. konvenční terapie
CARTITUDE-4 (NCT04181827)	III	Cila-cel	Fáze III R/R MM (po 1–3 liniích léčby) v. konvenční terapie

ALL – akutní lymfoblastová leukémie, CLL – chronická lymfocytární leukémie, MM – mnohočetný myelom, MRD – minimální reziduální nemoc, NHL – ne Hodgkinův lymfom, PET – pozitronová emisní tomografie, R/R – relabování/refrakterní, SoC – standard léčby.

MRN, čtyři však měli kompletní MRN negativní remisi již před podáním CAR-T. V souladu se zkušenostmi ve světě však i zde došlo k relapsu celkem u tří nemocných. Další pacient měl časnou regeneraci po prvním i druhém podání tisa-celu a vzhledem k výše uvedenému byl preemptivně transplantován bez mani-

festního relapsu. I zde budou data z ČR aktualizována k době konání hematologického sjezdu.

Brexu-cel je přípravek schválený v EU pro léčbu lymfomu z buněk pláště (MCL). Od přípravku axi-cel se liší tím, že před výrobou je provedena deplece CD19 lymfocytů, což brání aktivaci a ná-

slednému vyčerpání CAR-T lymfocytů in vitro. V registrační studii ZUMA-2, zahrnující pacienty po selhání léčby s antracykliny, rituximabem a inhibitorem Brutonovy kinázy byla bezprecedentně vysoká ORR (93 %) a CR (67 %). PFS bylo 61 % a OS 83% v jednom roce [7]. Negativem byla vysoká incidence CRS (celkem



91 %, grade 3–4 15 %) a zejména neurotoxicity (celkem 63 %, grade 3–4 31 %). Brexu-cel se osvědčil i při léčbě R/R ALL u dospělých pacientů (studie ZUMA-3) s dosažením CR/CRi u 71 % pacientů, medián přežití do relapsu (RFS) byl 14,2 měsíců pro pacienty, kteří dosáhli odpovědi. CRS a ICANS byly obdobně frekventované a těžké jako při léčbě pacientů s MCL [8].

Mnohočetný myelom je onemocnění, na jehož buňkách není exprimován antigen CD19. CAR-T specifita je proto cílená na jiné molekuly, jmenovitě B-buněčný maturační antigen (BCMA) a CD38. Ide-cel je přípravek recentně schválený v USA na základě registrační studie KarMMa. Zde byli trojitě refrakterní pacienti (na inhibitor proteazómu, imunomodulační látku a anti-CD38 protilátku) léčeni vzestupnými dávkami od 150×106 po 450×106 buněk. Dosaženo bylo celkem 73 % odpovědí, z toho u 33 % pacientů CR či stringentní CR (sCR). Procento dosažených odpovědí i jejich délky se zvyšovalo s počtem podaných CAR-T, přičemž pro pacienty léčené nejvyšší dávkou byl medián PFS 12,1 měsíců, na křivce však není patrné plateau. CRS bylo 84 %, ale pouze 5 %

nemocných mělo grade 3, příznivá je frekvence ICANS (18 % celkem, z toho 3 % grade 3) [9]. Dalším přípravkem v pokročilém stadiu schvalovacího procesu je cilta-cel (registrační studie CARTITUDE-1 na populaci trojitě refrakterních pacientů). Opticky jsou výsledky lepší než s předchozím preparátem (92 % pacientů dosáhlo minimálně velmi dobré kompletní remise – VGPR, procento sCR bylo 67 % a PFS 77 % v jednom roce), toxicita byla obdobná jako u ide-celu. Ani zde však na dosud publikovaných křivkách přežití není patrné plateau. Výsledky byly dosud publikovány pouze ve formě abstraktu [10].

Výběr z dalších zde nediskutovaných pokročilejších fází klinických studií je uveden v tab. 1. Jde o stávající preparáty, u kterých je patrná snaha o posun CAR-T léčby do časnějších linií a do nových indikací (nízce maligní lymfomy, chronická lymfatická leukémie). Některé z uvedených studií jsou randomizované fáze III, což dosud provedené registrační studie nebyly. Je potěšitelné, že klinické studie s CAR-T lymfocyty jsou připravovány i v České republice.

Závěrem lze říci, že léčba R/R ALL a R/R agresivních B-lymfomů pomocí CAR-T

lymfocytů si našla své místo ve světě a do popředí se dostává i v ČR. Léčba mnohočetného myelomu se etabluje. Aktuálními problémy kromě vysoké ceny je komplikovaná logistika spojená s výrobou autologního preparátu pro konkrétního pacienta, léčba pacientů refrakterních či relabujících po CAR-T terapii, ale i způsob a čas referování vhodných pacientů. Přímými konkurenty CAR-T lymfocytů ve stávajících indikacích jsou především bispecifické protilátky, jejichž největší výhodou je v okamžité dostupnosti.

### Literatura

1. Pytlík R et al, 2020. *Vaccines* (Basel) 8(4): E708.
2. Neelapu SS et al, 2017. *The New Engl J Med* 377: 2531.
3. Schuster SJ et al, 2019. *The New Engl J Med* 380: 45.
4. Abramson JS et al, 2020. *Lancet* 396: 839.
5. Yassine F et al, 2020. *Curr Res Transl Med* 68: 159.
6. Maude SL et al, 2018. *The New Engl J Med* 378: 439.
7. Wang M et al, 2020. *The New Engl J Med* 382: 1331.
8. Shah BD et al, 2021. *J Clin Oncol* 39 (Supplement 15): ASCO meeting abstract #7002.
9. Munchi NC et al, 2021. *The New Engl J Med* 384: 705.
10. Maduri D et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #177.

## Haploidentický versus nepříbuzný dárce, hlavní faktory při výběru

**Jindra P.**

*Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň*

Haploidentickým dárce rozumíme dárce, který má s příjemcem shodný (a společný) pouze 1 haplotyp – tedy typicky shodný 5/10 pokud kalkulujeme s 5 „transplantačními“ HLA geny (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQB1). Logicky jde o příbuzného dárce: buď sourozence či v případě mladých pacientů rodiče nebo naopak u starších pacientů jejich děti.

Může se ale samozřejmě jednat i o vzdálenější příbuzné či dokonce nevlastní sourozence. S ohledem na jejich teoretickou dostupnost pro většinu pacientů budili tito dárce zájem transplantační komunity od 90. let minulého století, nicméně vícečetná HLA neshoda se zdála být nepřekonatelnou bariérou. A i když v první dekádě našeho století byly nale-

zeny postupy, jak tuto HLA bariéru překonat (např. megadávky CD34+ buněk a jejich následná pozitivní selekce – Aversa et al. 2005), jejich složitost a relativně malá efektivita bránily širšímu praktickému využití. V 1. dekádě našeho století však byl publikován tzv. „baltimorský protokol“ (Luznik et al. 2008) spočívající z podání nemanipulovaného štěpu (zpo-

čátku pouze kostní dřeň, poté rutinně využívány i periferní krvetvorné buňky) s následným podáním cyklofosfamidu ve 3–5 dnech po převodu (tzv. PtCy) znamenal skutečnou revoluci v haploidentických transplantacích. Jeho jednoduchost a účinnost ve smyslu překonání HLA bariéry vedla k masovému rozšíření transplantací s haploidentickými dárci ve druhé dekádě našeho století. To potvrzují i data EBMT (Bone Marrow Transplant 2021) a CIBMTR (CIBMTR Summary slides 2020). Jestliže do roku 2010 bylo v Evropě a USA prováděno ročně pouze několik desítek transplantací s haploidentickým dárce (dále HaploSCT), v roce 2019 to bylo v Evropě již > 3 500, a > 2 000 v USA, což představuje cca 15–20 % všech provedených aloSCT v daném roce. Bylo publikováno nesčetně prací srovnávajících výsledky HaploSCT s transplantacemi s jiným typem dárce (přehledně např. Holtan et al, JCO 2021). Podrobnější rozbor by byl nad rámec sdělení, nicméně jejich zásadní výsledky lze stručně shrnout následně: výsledky jsou v podstatě srovnatelné se shodnými nepříbuznými dárci (MUD-SCT) a haploidentický dárce již tudíž nemůže být považován za tzv. „alternativního“ dárce, ale je to dárce stejně standardní, jako je plně shodný nepříbuzný dárce (MUD). Na druhou stranu, výše uvedená data EBMT a CIBMTR ukázala, že předpokládaný výrazný a setrvalý pokles MUD-SCT v důsledku jejich nahrazení HaploSCT se nekonal. Po přechodné stagnaci (nikoliv poklesu) MUD-SCT v letech 2013–2017 dochází k jejich vzestupu v letech 2018–2019. Naopak transplantace s pupečnickovou krví (UCB) od nástupu rutinních HaploSCT, které je evidentně vytlačují, vytrvale klesají. Zdá se tedy, že Haplo-SCT a MUD-SCT spíše koexistují, výhody HaploSCT (viz dále) spíše rozšířily dostupnost alogenních transplantací, takže je tato procedura proveditelná u více pacientů.

A právě uvedená srovnatelnost výsledků obou typů transplantací – HaploSCT i MUD-SCT – přináší jednak možnost určité personalizace dárce (MUD vs.

Haplo) pro specifického pacienta a současně dilemata, která jsou důvodem tohoto sdělení. Jak vybrat optimálního dárce pro specifického pacienta bez HLA shodného sourozence? Respektive jaké jsou determinující faktory ovlivňující volbu mezi MUD a haplo dárce?

Výběr jakéhokoliv alogenního dárce obecně ovlivňují tyto hlavní faktory:

1. HLA shoda;
2. časová dostupnost dárce (štěpu);
3. věk dárce;
4. CMV status příjemce/dárce;
5. pohlaví dárce (u mužského příjemce);
6. ABO kompatibilita;
7. množství dostupných krvetvorných buněk (typ štěpu, UCB...);
8. faktory na straně příjemce – přítomnost donor-specifických protilátek (DSA), nadměrná váha příjemce...;
9. vrozené predispozice (rodinný dárce, CHIP).

Výše uvedenou hierarchii nutno považovat za orientační a především relativní. V individuálních případech je totiž pořadí na tomto „žebříčku“ faktorů velmi variabilní, faktory se vzájemně prolínají a často mohou být i ve vzájemné kontradikci. Např. v urgentních indikacích je rychlá dostupnost dárce zásadní a může převážit ostatní faktory vč. HLA shody. Anebo na druhé straně dostupný haploidentický dárce je oproti MUD starší, s CMV neshodou a třeba navíc váhovým nepoměrem, což favorizuje MUD, který má tyto faktory příznivější. Přesto lze říci, že pro většinu konkrétních transplantací jsou faktory na 1.–4. místě zásadní.

Nyní se pokusím některé z uvedených faktorů alespoň trochu detailněji rozebrat.

## HLA SHODA

Zdá se, že celkové výsledky HaploSCT s PtCy jsou srovnatelné s transplantací s kompletně, tj. 10/10 shodným MUD (Gagelmann et al., JAMA Oncology 2019). Přesto je v neurgentních případech nadále spíše doporučován MUD před Haplo, zvláště je-li možno volit mezi více dárci a optimalizovat tak tzv.

nonHLA faktory (např. Lee et al. Haematologica 2017). Na druhou stranu existují silná data, že HaploSCT přináší celkově lepší výsledky než SCT s částečně shodným nepříbuzným dárce (PMUD). To reflektuje i doporučení EBMT, které u pacientů s akutní myeloidní leukémií preferuje Haplo dárce před PMUD a v případě urgentní transplantace dokonce i před MUD (Lee et al., Haematologica 2017). Hodnocení výsledků s různými typy dárce je dále komplikováno rostoucím použitím PtCy i u MUD či PMUD, což dále „vyrovňuje“ celkové výsledky. Stejně tak má zřejmě vliv i stav základního onemocnění (remise či mimo remise), intenzita přípravného protokolu (myeloablativní či neyeloablativní), GVHD profylaxe u MUD (standardní s ATG či PtCy) anebo zdroj krvetvorných buněk (kostní dřeň vs. periferní krvetvorné buňky). Je evidentní, že přímé srovnání MUD vs. Haplo vs. PMUD je extrémně komplikované, navíc dosud založené primárně na retrospektivních analýzách se všemi jejich slabiny. Nicméně lze říci, že aktuálně jsou MUD i Haplo dárce vnímáni jako zcela srovnatelné, validní volby, které jsou v „hierarchii“ dárce preferovány před PMUD. HaploSCT mají konzistentně nižší incidenci a tíži chronické GVHD, na druhé straně mohou mít v určitých situacích vyšší riziko relapsů, takže celkové přežití je u obou typů dárce srovnatelné. O jejich preferenci tak rozhodují především tzv. nonHLA faktory (viz body 2–9 výše), z nichž je na prvním místě urgentnost transplantace a z toho plynoucí dostupnost dárce, klinický stav příjemce a nemalou roli pak hrají i zkušenosti a preference daného pracoviště.

## FAKTORY MIMO HLA

Zde hraje prim především již výše zmíněná urgentnost provedení SCT, která s ohledem na delší časový interval od identifikace k odběru krvetvorných buněk u MUD preferuje Haplo dárce. Z dalších faktorů je jak u MUD, tak u Haplo dobře popsán význam CMV shody u dárce a příjemce. Ta je zvláště

důležitá v případě CMV negativních příjemců (Ciurea et al, Bone Marrow Transplant 2019 či Ljungman et al, Clin Infect Dis 2014)

Podobně je vcelku dobře doložen i význam věku dárce u obou skupin. Velká analýza CIBMTR prokázala jednoznačně negativní efekt rostoucího věku nepříbuzných dárce na přežití (Kollman et al., Blood 2016). Zdá se, že podobný negativní efekt rostoucího věku dárce platí i u HaploSCT (Perales et al, Haematologica 2020), což by v řadě případů zvyšovalo MUD, kteří jsou přirozeně většinou mladší. Na druhé straně některé studie dokládají, že efekt věku dárce u HaploSCT je významný pouze u starších příjemců a u mladších pacientů nehraje zásadní roli (Canaani et al., Am J Hematol 2018). Další otázkou je preference typu haplo dárce – máme preferovat děti před rodiči či u starších nemocných sourozence před dětmi? Dosavadní data neposkytují jednoznačnou odpověď. Nicméně z praktického hlediska je vždy jednodušší vybírat mladého dárce (méně komorbidit, bezpečnější odběr apod.). Je tedy obecně rozšířenou klinickou praxí, že podobně jako u MUD jsou u HaploSCT preferováni mladší dárce bez ohledu na příbuznost. Další společnou praxí je preference muž-

ského dárce před ženským dárce (Ciurea et al, Bone Marrow Transplant 2019).

HaploSCT však mají jeden specifický důležitý faktor, který u MUD není relevantní, a tím jsou tzv. donor specifické protilátky (DSA). DSA u příjemce zásadně kompromitují výsledky HaploSCT s tímto dárce, především pro vysoké riziko selhání štěpu (McCurdy et al., Blood 2019). Přítomnost DSA je tak u HaploSCT jedním z klíčových faktorů ovlivňujícím jednak výběr mezi několika potenciálními haplo dárce, a jednak vůbec případnou selekci haplo dárce jako takového. Není-li k dispozici MUD, je v těchto případech dokonce preferován PMUD.

V poslední době se objevil ještě další zajímavý faktor, který je specifický výhradně pro HaploSCT a který souvisí s nástupem NGS technologie. Myeloidní leukémie s genetickou (rodinnou) predispozicí se totiž zdají být mnohem častějším fenoménem, než se doposud soudilo, dokonce je to nová kategorie ve WHO klasifikaci 2016 (Myeloid Neoplasm with Germline Predisposition). Je logické, že u pacientů s tímto typem leukémie musí být potenciální haploidentičtí (rodinní) dárce vyšetřeni stejným způsobem jako pacient a v případě přítomnosti genetické predispozice jako dárce vyloučeni.

## ZÁVĚR

Z výše uvedeného je zřejmé, že vybrat mezi haploidentickým a shodným nepříbuzným dárce není jednoduché, zvláště pokud jich u obou typů máme k dispozici několik. Preference je ovlivňována mnoha faktory, které mají v individuálních případech variabilní váhu a nelze stanovit univerzální algoritmus. Nicméně opakovaně doložený fakt, že obecně by neměl být rozdíl ve výsledku transplantace mezi MUD a haplo dárce, může výběr zjednodušit. Jak bylo opakovaně uvedeno, zcela zásadní je dostupnost dárce dle potřeby specifického pacienta a jeho diagnózy a pak se již můžeme orientačně řídit hierarchií různých faktorů uvedených v tabulce výše.

Možnost výběru mezi několika dárce různých typů musíme vnímat nikoliv jako komplikaci, ale jako možnost dále optimalizovat výsledky alogenní transplantace prostřednictvím jakési „personalizace“ dárce pro specifického pacienta. Je vlastně velkým štěstím, že u pacientů bez HLA shodného sourozence jsme se posunuli od hledání „nějakého“ (jakéhokoliv) dárce k hledání toho „nejlepšího“ mezi několika či dokonce mnoha dostupnými dárce, ať již nepříbuznými či haploidentickými.

## Potransplantační cyklofosfamid – univerzální profylaxe u všech typů dárce? Kontra

Folber F., Krejčí M.

Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN Brno

### ÚVOD

Alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (alo-HSCT) je základní léčebnou modalitou u velké části pacientů s akutními leukemiemi, myelodysplastickým syndromem v nižším věku, relabovanými lymfomy a dal-

šími onemocněními. Mezi hlavní rizika alo-HSCT patří na jedné straně infekční komplikace a akutní nebo chronická reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), se kterými souvisí nerelapsová mortalita (NRM), ovlivňující celkové přežití (OS). Na druhé straně stojí relaps základního

onemocnění (kumulativní incidence relapsu, CIR), která ovlivňuje jak OS, tak přežití bez relapsu (RFS). Jedním z kombinovaných ukazatelů je pak přežití bez GvHD a relapsu (GRFS).

Za účelem zamezení rejekce štěpu a současně rozvoje GvHD je jako základ

používána imunosuprese obsahující nejčastěji kalcineurinový inhibitor (v Evropě obvykle cyklosporin A, CsA) v kombinaci s metotrexátem (MTX) nebo mykofenolat mofetilem (MMF).

Mnoho bylo napsáno ohledně zlepšení výsledků aloHSCT, zejména zlepšení OS/RFS a snížení výskytu relapsu, GvHD, infekcí a NRM. V současné době lze sledovat dva hlavní proudy, jak části toho dosáhnout – potransplantační cyklofosfamid (ptCy) a antithymocytární nebo antilymfocytární globulin (ATG, ATLG).

## POTRANSPLANTAČNÍ CYKLOFOSFAMID, PANUJÍ NEJASNOSTI?

O ptCy a jeho výhodách bylo zevrubně hovořeno v protilehlé části tohoto sdělení (PRO).

Přestože je ptCy brán jako neměnný fakt, existuje i v tak základní věci, jako je jeho podání, několik nejasností až kontroverzí:

- Je dávka 2× 50 mg/kg optimální?
- Měl by být ptCy podán den +3 a +5, nebo jsou i jiné varianty? A záleží na tom?
- Musí být CsA zahájen opravdu až den +5? Nebo již dříve? A nechrání pak nejvíce reaktivní formy alogenních T lymfocytů?
- Je spolu s ptCy vždy standardem MMF? A nezvyšuje riziko infekcí?
- Pokud je cyklofosfamid také součástí přípravného režimu, lze jej bez rizika zaměnit za ptCy? Nebo zopakovat?
- Musí být přípravný režim nějak dále připůsoben podání ptCy?
- Je ptCy účinný a bezpečný při použití krvetvorných kmenových buněk z periferní krve stejně jako u kostní dřeně?
- Není preference ptCy ovlivněna jeho cenou, zejména v porovnání s ATG?

Některé z otázek jsou jistě kontroverzní, jiné jsou spíše řečnické, ale část z nich zůstává stále nezodpovězena.

## RIZIKA CYKLOFOSFAMIDU, ZNÁMÁ ČI NEZNÁMÁ?

Již časně po podání štěpu se může objevit **syndrom z uvolnění cytokinů** (CRS).

Jde o období komplikace známé z léčby CAR-T lymfocyty. Zde se ale syndromu účastní aloreaktivní T lymfocyty přítomné ve štěpu, které při použití ptCy nejsou v první dny po podání obvykle nijak suprimovány. Výskyt a závažnost CRS stoupá s počtem T lymfocytů v podaném štěpu, zejména získaném z periferní krve, a při použití režimů s redukovanou intenzitou. A naopak klesá po podání ptCy, kortikoidů nebo tocilizumabu. Podle různých prací se incidence CRS po haplo-HSCT s ptCy různí, ale vždy se pohybuje velmi vysoko, okolo 80 %. V případě transplantací od HLA-identických nebo shodných nepříbuzných dárců s ptCy je nižší, přibližně 20 %. Z hlediska závažnosti jde nejčastěji o nižší stupně spojené hlavně s febriliemi a hypotenzí. Závažnější formy CRS jsou naštěstí vzácné, v řádu jednotek procent [1].

Další možnou komplikací vysokých dávek cyklofosfamidu je **hemoragická cystitida**. Tato je obvykle dobře preventabilní forsírovanou diurézou a kontinuálním podáním mesny. Nicméně predisponovaný terén je v kombinaci s imunosupresí náchylný k recidivujícím BK virovým infekcím. Můžeme zde pozorovat třífázový průběh: 1) přímé poškození sliznice močového měchýře cyklofosfamidem, 2) reaktive dosud latentního BK viru následkem imunosuprese, 3) zánět sliznice po obnově imunitních funkcí. Podle různých prací se výskyt hemoragické cystitidy po ptCy, ať už související s BKV nebo ne, pohybuje okolo 35 %, přičemž častější je při použití haploidentického dárce [2].

Nepříjemnou komplikací aloHSCT je reaktive **cytomegaloviru** (CMV), zejména u séropozitivních příjemců. Velká analýza amerického registru CIMBTR ukázala, že reaktive CMV byly po ptCy signifikantně častější bez ohledu na typ dárce, a dokonce vedly k vyššímu výskytu chronické GvHD a zhoršení přežití. Jde tedy o situaci vyžadující moderní profylaxi a bedlivé sledování [3].

Dříve zmiňovaným nežádoucím účinkem cyklofosfamidu byla také **kardio-toxicita**. Dostupné práce neposkytují

dostatečnou metodickou jistotu pravidelného kardiologického sledování. V největší z nich bylo zjištěno, že preexistující kardiomyopatie není rizikovým faktorem pro kardiotoxicitu ptCy. Po transplantaci došlo k mírnému poklesu ejekční frakce levé komory. Potransplantační kardiomyopatie byla pozorována ve 22 % případů a souvisela se zvýšenou mortalitou. Ve srovnání s referenční skupinou však nebyl pozorován vliv ptCy. Většina těchto komplikací byla spojena s infekcí, ať už sepsí, septickým šokem nebo febrilní neutropenií. U dvou třetin pacientů, kteří tyto komplikace přežili, byla navíc pouze přechodná [4].

## EXISTUJE ALTERNATIVA, NEBO DOKONCE STANDARD?

Pokud bychom se chtěli z jakéhokoliv důvodu ptCy vyhnout, můžeme se podívat na druhou stranu barikády.

Konsenzem mezinárodního panelu expertů bylo doporučeno použití ATG v situacích schnutých v tab. 1 [5].

Existují podobná, na důkazech založená doporučení, i pro ptCy?

## DUEL: SROVNÁNÍ PTCY VS. ATG A (S)MÍR?

Prací, které by přímo srovnávaly ptCy a ATG, není mnoho. Velkou iniciativu v této oblasti přebrala EBMT, která nyní provádí retrospektivní analýzy jednotlivých podskupin ve svém registru.

Zatím byly publikovány následující zajímavé práce srovnávající ptCy s ATG:

**HLA-identický dárce** u AML [6]: Do této analýzy bylo zařazeno celkem 2 110 pacientů. Skupina ptCy se od ATG lišila zejména nižším počtem nemocných, jejich nižším věkem a častějším použitím kostní dřeně a myeloablativních režimů, což znesnadňuje přímé srovnání. Kromě mírně rychlejšího přihojení po ATG se však skupiny lišily pouze statisticky významně nižším výskytem chronické GvHD po ATG (30 vs. 37 % ve 2 letech; p = 0,02).

**Plně shodný nepříbuzný dárce** u AML v první remisi [7]: Do této analýzy

bylo zařazeno celkem 1 626 pacientů. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ve výskytu akutní nebo chronické GvHD ani jejích závažných forem. Ani v dalších parametrech výskytu relapsu, mortality nebo přežití nebyl nalezen rozdíl.

**Nepříbuzný dárce s jednou neshodou** u AML, první transplantace [8]: Do této analýzy bylo zařazeno celkem 272 pacientů. Ve skupině s ptCy byla pozorován výrazně nižší výskyt závažné akutní GvHD (9 vs. 19 %;  $p < 0,04$ ) a lepší GRFS (37 vs. 21 % ve 2 letech;  $p < 0,03$ ).

**Haploidentický dárce** u ALL dospělých [9]: Do této analýzy bylo zařazeno celkem 434 pacientů. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ve výskytu akutní a chronické GvHD. Ve skupině s ptCy bylo pozorováno lepší přežití (HR 0,6 pro OS;  $p = 0,003$ ) a nižší incidence relapsů (HR 0,61;  $p = 0,03$ ).

Kombinace ptCy a ATG se také objevují, protože nic není černobílé. Např. kanadská analýza 159 pacientů s AML a MDS vysokého rizika ukázala při použití této kombinace snížený výskyt závažné akutní GvHD (4 vs. 20 %;  $p = 0,004$ ), chronické GvHD (19 vs. 41 %;  $p = 0,003$ ) a lepší přežití (HR 0,69 pro GRFS;  $p = 0,04$ ), aniž by byla negativně ovlivněna CIR nebo NRM [10]. Nabízí se ale otázka (a částečně i daty potvrzuje), zda již tato kombinace není zatížena nadměrnou toxicitou.

## ZÁVĚR

Několik zamyšlení k diskuzi:

- 1) Něco je lepší než nic; téměř jakýkoliv třetí lék přidaný ke standardní dvoulékové imunopresi bude nějakým způsobem fungovat.
- 2) Když něco použít, pak lék s lepšími výsledky; potransplantační cyklofosfamid je prokázán a dostatečně ověřený jedině v situaci haploidentické transplantace.
- 3) Když očekáváme stejné výsledky, pak použijme lék s lepším profilem toxicity; potransplantační cyklofosfamid

Tab. 1.

dárce	zdroj buněk	přípravný režim	doporučení pro ATG
HLA-identický	PB	MAC	ANO
		RIC/NMA	ANO, ale zohlednit riziko relapsu
	BM	MAC	není dostatek dat
		RIC/NMA	ANO, ale zohlednit riziko relapsu
nepříbuzný plně shodný	PB/BM	MAC	ANO
		RIC/NMA	ANO, ale zohlednit riziko relapsu
nepříbuzný s neshodou	PB/BM	MAC	ANO
		RIC/NMA	ANO, ale zohlednit riziko relapsu
haploidentický	PB/BM	s ptCy	nejasně
		bez ptCy	podle protokolu
CB	CB	jakýkoliv	nejasně
pro nemaligní onemocnění	jakýkoliv	jakýkoliv	ANO

PB – periferní krev, BM – kostní dřeň, MAC – myeloablativní přípravný režim, RIC – přípravný režim s redukovanou intenzitou, NMA – nemyeloablativní přípravný režim, CB – pupečnicková krev

s sebou nese významnou a specifickou toxicitu.

- 4) Když připustíme určitou toxicitu za určitou cenu, vyplatí se to?
- 5) Existuje vždy univerzální řešení?

## Literatura

1. Solán L, Landete E, Bailén R, et al. Cytokine release syndrome after allogeneic stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *Hematol Oncol.* 2020;38:597–603.
2. Copelan OR, Sanikommu SR, Trivedi JS, et al. Higher incidence of hemorrhagic cystitis following haploidentical related donor transplantation compared with matched related donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25:785–790.
3. Goldsmith SR, Abid MB, Auletta JJ, et al. Post-transplant cyclophosphamide is associated with increased cytomegalovirus infection: a CIBMTR analysis. *Blood* 2021;137(23):3291–3305.
4. Lin CJ, Vader JM, Slade M, et al. Cardiomyopathy in patients after posttransplant cyclophosphamide-based hematopoietic cell transplantation. *Cancer* 2017;123(10):1800–1809.
5. Bonifazi F, Rubio MT, Bacigalupo A, et al. Rabbit ATG/ATLG in preventing graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: consensus-based recommendations by an international expert panel. *Bone Marrow Transplant* 2020;55:1093–1102.
6. Battipaglia G, Labopin M, Hamladji RM, et al. Post-transplantation cyclophosphamide versus antithymocyte globulin in patients with acute myeloid leukemia undergoing allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors: a retrospective analysis from the Acute leukemia working party of the European society for blood and marrow transplantation. *Cancer* 2021;127(2):209–218.
7. Brissot E, Labopin M, Moiseev I, et al. Post-transplant cyclophosphamide versus antithymocyte globulin in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission undergoing allogeneic stem cell transplantation from 10/10 HLA-matched unrelated donors. *J Hematol Oncol* 2020;13(1):87.
8. Battipaglia G, Labopin M, Kröger N, et al. Post-transplant cyclophosphamide vs antithymocyte globulin in HLA-mismatched unrelated donor transplantation. *Blood* 2019;134(11):892–899.
9. Nagler A, Kanate AS, Labopin M, et al. Post-transplant cyclophosphamide versus anti-thymocyte globulin for graft-versus-host disease prevention in haploidentical transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2021;106(6):1591–1598.
10. Alanazi W, Chen S, Lipton JH, et al. Post-transplant cyclophosphamide combined with anti-thymocyte globulin as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic cell transplantation in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2021;144:66–73.

## Potransplantační cyklofosamid: univerzální profylaxe u všech typů dárců? Pro

Cetkovský P.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Po celou dobu historie transplantací hematopoetických buněk (*hematopoietic cell transplantation* – HCT) bylo základním předpokladem provedení výkonu co největší shoda v HLA systému mezi dárcem a příjemcem. Důvodem bylo co nejvíce omezit imunologické komplikace: rejekci štěpu a nemoc z reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease – GvHD). V důsledku těchto pravidel však existovalo mnoho nemocných, pro něž se navzdory přibývajícemu množství dobrovolných dárců v registrech dárců nenašel (vhodného sourozence mívá 20–30 % nemocných). Po desetiletí se proto vědci i lékaři snažili rozšířit pool možných dárců o tzv. alternativní zdroje: pupečnickovou krev, částečně neshodné nepříbuzenské dobrovolníky či haploidentické rodinné dárci. Haploidentické programy se dlouho nedařily, neboť kromě extrémní finanční nákladnosti (složitá manipulace se štěpem, séroterapie atd.) byly zatíženy obrovským množstvím komplikací, hlavně selháním štěpu či infekcemi nebo těžkou GvHD s úmrtností často převyšující 50 %. To vedlo ke skutečnosti, že naprostá většina transplantčních center tyto programy opustila a nerozvíjela.

Vše se změnilo před 2 dekádami, kdy vědecký tým z Baltimoru publikoval první výsledky haploidentických rodinných HCT s použitím potransplantačního cyklofosamidu (ptCy). Tato jednoduchá a levná profylaxe GvHD kompletně změnila rozhodovací algoritmus při výběru dárci na většině pracovišť a HCT od příbuzných haploidentických dárců se staly běžně prováděnou metodou (proto se v současné době najde dárci pro téměř všechny nemocné). Mnohé publikace,

včetně multi-institucionálních klinických studií, potvrdily bezpečnost a účinnost tohoto typu profylaxe a dokázaly, že haploidentické HCT s ptCy dosahují výsledků srovnatelných s použitím štěpů od shodných sourozenců či nepříbuzných dobrovolníků [1–4] jak u režimů s redukovanou intenzitou (RIC HCT), tak i po myeloablativních přípravách (MAC HCT).

Finanční nenáročnost a porovnatelné (či zlepšené) výsledky vedly k tomu, že se tento postup (profylakticky podávaný ptCy) začal aplikovat i u jiných typů HCT než pouze v haploidentických programech, např. u skupiny s nejhoršími výsledky: u nepříbuzných částečně neshodných dárců. Studie 5 prokázala, že aplikace ptCy umožňuje bezpečné a efektivní provedení HCT od částečně neshodného dobrovolníka z registru (miss-matched unrelated donor, MMUD – až do neshody 5/10) s výsledky podobnými jako u haploidentické HCT. Simultánně s průkazem zlepšených výsledků u MMUD se pozornost začala soustředit i na HCT s HLA shodnými dárci (*matched donor transplant* – MDT), ať příbuznými (*matched sibling donors* – MSD) či nepříbuznými dobrovolníky (*matched unrelated donors* – MUD); souhrn z těchto studií je komentován v publikaci 6. Porovnatelné výsledky jsou publikovány ve studiích 7–10. Kromě pravděpodobného potenciálu redukovat incidenci GvHD má ptCy další atraktivní vlastnosti: vedle jednoduché aplikace je to především jeho možné využití jako platformy pro vývoj alternativní, méně toxické profylaxe GvHD bez použití kalcineurinových inhibitorů (tzv. calcineurin inhibitor free regimen), např. v kombinaci s proteasome inhibitory.

Zatímco čekáme na výsledky randomizovaných studií s použitím ptCy jak pro RIC HCT (např. BMT CTN 1703 a HOVON 96 trial), tak i MAC HCT (např. BMT-CTN 1301) (které doufejme potvrdí optimistické výsledky dosahované v nerandomizovaných či retrospektivních studiích), některá pracoviště již bezpečně převedla tuto novou strategii GvHD profylaxe (ptCy) do každodenní klinické praxe [např. 8]. Ve srovnání se „starým“ postupem a dosáhla zlepšení nerelapsové mortality (NRM), porovnatelných počtů relapsů, celkového přežití (OS) či přežití bez progresu (PFS) s trendem mírně pozitivním pro skupinu s ptCy (statistické významnosti pravděpodobně zabránil jen nižší počet pacientů v tomto rameni), častějšího ukončení imunosuprese (polovina nemocných po 1 roce od HCT) atd. Obě probíhající randomizované studie přinesou nejen kontrolu výsledků výše popsaných parametrů, ale i další, jako počet infekcí, přežití bez nemoci bez nutnosti aplikovat imunosupresi (DFOI), zjištění ceny za opakované přijetí do nemocnice z důvodu GvHD či léčby infekčních komplikací, atd. A tyto důležité výsledky by mohly pomoci definitivně určit, zda je ptCy novým standardem GvHD profylaxe i u MDT. A protože na ClinicalTrials.gov je zaregistrováno 165 studií zkoumajících podávání ptCy, tak nám další výsledky určitě v brzké době situaci objasní.

Souhrnem lze říci, že výsledky na autorově pracovišti (potvrzující publikovaná data z jiných center) dokládají vyšší účinnost a bezpečnost GvHD profylaxe aplikací ptCy u haploidentických a MMUD HCT a staly se standardem léčby. Efekt u MUD je zatím porovnatelný se starým

postupem (ATG a Cy/MTX či Cy/MMF profylaxe) a bude nadále zkoumán. Nicméně je autorovým hlubokým přesvědčením, že ptCy se v brzké době stane platformou nové GvHD profylaxe (a u části nemocných /např. MDT/ vedoucí k vývoji alternativní, méně toxické profylaxe GvHD bez použití kalcineurinových inhibitorů), umožňující aplikaci imunoterapie či malých chytrých molekul v prevenci relapsu po alogenních HCT.

## Literatura

1. McCurdy SR et al. Risk-stratified outcomes of nonmyeloablative HLA-haploidentical BMT with high-dose posttransplantation cyclophosphamide. *Blood*.2015;125:3024–3031.
2. Ciurea SO et al. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126:1033–1040.
3. Kanate AS et al. Reduced intensity transplantation for lymphomas using haploidentical related donors vs HLA matched sibling donors. *Blood*. 2016;127:938–947.
4. Ghosh N. et al. Reduced intensity transplantation for lymphomas using haploidentical related donors vs HLA matched sibling donors: a CIBMTR analysis. *J Clin Oncol*. 2016;34:3141–3149.
5. Kasamon YL et al. Prospective study of nonmyeloablative, HLA-mismatched unrelated BMT with high dose posttransplantation cyclophosphamide. *Blood Adv*. 2017;1:288–292.
6. Williams L et al. Post-transplantation cyclophosphamide: From HLA-haploidentical to matched-related and matched-unrelated donor blood and marrow transplantation. *Front Immunol* 2020;11(636):1–7.
7. Volodin L. Are we ready for post-transplant cyclophosphamide use in matched donor transplant? *BMT* 2021;56:1235–1237.
8. Cooper DL et al. Incorporation of post-transplant cyclophosphamide as part of standard immunoprophylaxis for all allogeneic transplant: a retrospective, single institution study. *BMT* 2021;56:1099–1105.
9. Ruggeri A et al. Post-transplant cyclophosphamide for GvHD prophylaxis in matched sibling or matched unrelated donor transplant for patients with acute leukemia, on behalf of ALWP-EBMT. *J Hematol Oncol* 2018;11:40.
10. Sanz J et al. Post-transplant cyclophosphamide after matched sibling, unrelated and haploidentical transplants in patients with AML: a comparative study of the ALWP EBMT. *J Hematol. Oncol*. 2020;13:40.

# Systémová mastocytóza

Kozák T.

FNKV, Praha

Systémová mastocytóza (SM) je klonální onemocnění převážně dospělého věku, při kterém dochází k nekontrolované proliferaci a akumulaci mastocytů v kostní dřeni a dalších orgánech a tkáních. Fenotyp onemocnění je široký, od zcela indolentního náhodně zjištěného onemocnění přes nepředvídatelné epizody těžkých alergických a anafylaktických reakcí po agresivní nádorové onemocnění nebo přímo mastocelulární leukémii. Vzhledem k tomu, že jde o relativně vzácné onemocnění, je diagnostika i léčba SM výzvou, neboť neexistují jednoznačná doporučení, která by se opírala o výsledky větších kontrolovaných studií.

Mastocyty fyziologicky migrují z kostní dřene jako mastocytární progenitory (MCp) a osidlují tkáň v okolí malých cév a nervových vláken, nejvíce kůži a sliznici, trávicího a urogenitálního traktu. Funkčně mají mastocyty řadu podobných vlastností jako makrofágy, mastocyty jsou součástí vrozené i získané imunitní reakce, patří mezi antigen prezentující buňky, jsou to také první efekторы, které se setkávají s patogeny a toxiny zevního prostředí a pomáhají zahájit imunitní odpověď. Mastocyty exprimují řadu receptorů, například Fc receptor, který detekuje protilátky specifické pro daný patogen v místě zánětu, nebo tzv. Toll-like receptory, které detekují patogen přímo. Přímou degranulaci mastocytů a uvolnění vasoaktivních a prozánětlivých látek z granulí mastocytů způsobuje řada exogenních i endogenních látek. Z exogenních to jsou zejména hmyzí jedy a antigeny injikované přímo do kůže, z endogenních substancí jde zejména o látky vznikající v místě akutního zánětu, jako neurotensin, substance P, endotelin a C5a složka komplexu. Také spolupráce s T lymfocyty

(zejména Th2), vede k větší migraci mastocytů z kostní dřene a jejich rychlé akumulaci v místě zánětu.

Při aktivaci mastocyty uvolňují okamžitě z cytoplazmatických granulí histamin a tumor necrosis factor (TNF), dále leukotrieny a prostaglandiny a s určitým zpožděním také cytokiny, zejména interleukin 4 (IL-4), vše s cílem jednak lokálně zvýšit permeabilitu cév, jednak dát chemotaktický impuls pro další prozánětlivé buněčné efekторы. Kromě výše uvedených látek obsahují vesikuly mastocytů také proteázy, zejména tryptázu a chymázu.

## PATOGENEZE SYSTÉMOVÉ MASTOCYTÓZY

Proliferace mastocytů je podporována několika cytokiny, například IL-4 (vč. autokrinní stimulace) a zejména faktorem kmenových buněk (SCF). Receptorem pro SCF, kterým je KIT, mutace genu *c-kit* má klíčový význam v patogenezi systémové mastocytózy. Téměř ve všech případech SM jde o bodovou mutaci D816V, která vede k trvalé aktivaci KIT postižením fosfotransferázové domény, nekontrolované proliferaci a akumulaci mastocytů. Tato mutace postihuje intracelulární část receptoru KIT. V 80–90 % případů je prokazatelný tento typ mutace u SM u dospělých pacientů, v závislosti na citlivosti testu (nejčastěji na bázi RT-PCR) a na materiálu. Při tom míra pozitivivity je stejná u agresivní i indolentní formy SM.

## EPIDEMIOLOGIE SM

Vzhledem k relativní neobvyklosti tohoto onemocnění a k tomu, že řada pacientů s indolentní formou SM je nediodagnostikována, je pochopitelné, že epidemiologická data jsou zatím skromná. Z publikovaných prací lze in-

cidenci SM u dospělých odhadnout na 0,89/100 000, prevalenci pak na 9,59/100 000. Nejčastější formou je indolentní systémová mastocytóza (ISM), reprezentující 46–82 % všech SM, 4–40 % tvoří SM asociovaná s jinou nemastocytární hematologickou neoplázií (SM-AHN), zatímco agresivní systémová mastocytóza (ASM) 2–12 % a vzácná mastocytární leukémie (MCL) jen 1 %.

## KLINICKÝ OBRAZ SYSTÉMOVÉ MASTOCYTÓZY

Obecně je symptomatologie SM odvozena od dvou základních patogenetických mechanismů: uvolňování zánětlivých vasoaktivních mediátorů, zejména histaminu (mediátorový syndrom) a infiltrace orgánů s jejich selháním (nádorový syndrom). Indolentní SM není spojena s žádnými příznaky nebo je přítomný mediátorový syndrom různé intenzity, u pokročilých forem SM (ASM) dominuje naopak nádorový syndrom, příznaky z uvolnění mediátorů se u nich mohou objevovat také.

Do klinického obrazu SM patří také depresivní syndrom, poruchy spánku a úbytek kognitivních funkcí. Deprese a poruchy spánku obvykle dobře reagují na zahájení terapie. Mezi celkové, tzv. konstituční příznaky patří u SM také únava, anorexie, noční pocení a úbytek na váze, předpokládá se, že podíl na jejich vzniku mají zejména cytokiny IL-1 $\beta$  a IL-6.

Další celkové příznaky SM jak indolentního typu, tak agresivního, mohou zahrnovat anafylaktické reakce na nejrozličnější podněty, nejčastěji na píchnutí blanitým hmyzem (zejména vosy), na potraviny bohaté na histamin (ryby, zrající „modré“ sýry apod.), po některých léčících (aspirin, NSAID apod.), výrazným spouštěčem uvolnění mediátorů je alko-



hol. Často ale přicházejí alergické reakce zcela neočekávaně na podněty dosud tolerované nebo neznámé, včetně emočního vypětí.

U obou skupin, více u indolentních forem, se může vyskytovat typické chronické kožní postižení ve formě urticaria pigmentosa (UP). Toto kožní onemocnění může být velmi nápadné nebo může být přítomno jen několik málo kožních morf. Urticaria pigmentosa postihuje trup a končetiny, jde obvykle pouze o dlouhotrvající kosmetický defekt, který však nečiní žádné obtíže.

U všech forem SM se mohou vyskytovat epizodická zarudnutí (flush) generalizovaná nebo i lokální po mechanickém podráždění (tzv. Darrierovo znamení), bývá přítomen pruritus, často velmi intenzivní, který ale dobře odpovídá na terapii SM.

Známkou intermitentního vyplavování mediátorů jsou abdominální příznaky, například náhlé koliky s imperativními průjmy a zvracením. Ty mohou být přítomny samy nebo ve spojení s přechodným kožním flushem a kolapsem s tachykardií a hypotenzí. Průjem trvající delší dobu s postupnou malnutricí až kachexií jsou spíše známkou infiltrace sliznice GIT mastocyty u ASM. Hlavní kardiiovaskulární příznaky u SM jsou palpitace při tachykardii, hypotenze nebo hypertenze, synkopa. Méně často se u SM vyskytuje perikardiální výpotek. Jedním z významných příznaků pokročilé systémové mastocytózy (ASM) je kostní postižení. U SM se mohou vyskytnout jako osteolytická, tak osteoplastická ložiska, často imitující metastázy solidního tumoru. SM může provázet těžká difuzní osteoporóza. Ložisková osteolýza, resp. těžká difuzní osteoporóza mohou být příčinou patologických fraktur. Kostní změny u SM jsou důsledkem zvýšeného kostního obrátu způsobovaného zvýšenou lokální sekrecí tryptázy, histaminu a heparinu.

Specifickou jednotkou v rámci SM je forma s lymfadenopatií, je často provázena eosinofilií. Pro diagnostiku je důležité vyloučit jednak současně probíhající maligní lymfoproliferaci, jednak jiné klo-

nalní onemocnění s eosinofilií a mutací PDGFR.

Méně častým orgánem postiženým přímou infiltrací mastocyty jsou plíce, kde se může SM projevit v podobě intersticiálního postižení.

Zvýšená tendence ke krvácení je u SM způsobena několika faktory, kromě trombocytopenie a trombocytopenie může být způsobena aktivací mastocytů s uvolňováním mediátorů, mimo jiné také heparinu.

U SM, která je spojena s jiným nemastocytárním hematologickým klonálním onemocněním (SM-AHN), obvykle dominuje symptomatologie příslušné asociované hematologické malignity. Nejčastěji jde o chronické myeloproliferativní onemocnění (MPN), chronickou myelomonocytární leukémii (CMML), akutní myeloblastovou leukémii (AML), myelodysplastický syndrom (MDS), méně často o maligní lymfoproliferaci (NHL) nebo o mnohočetný myelom (MM).

## DIAGNOSTIKA A KLASIFIKACE SYSTÉMOVÉ MASTOCYTÓZY

Kritéria ke stanovení diagnózy systémové mastocytózy jsou uvedena v tab. 1. Mastocyty mají atypickou morfologii, v nátěru kostní dřene jsou obvykle vřetenitého tvaru nebo mladšího typu. V praxi je poměrně častá situace, kdy je počet mastocytů v aspirátu KD jen lehce zvýšen, ale jsou atypického vzhledu a histologie KD potom prokáže typické denzní multifokální agregáty. Těžká difuzní infiltrace kostní dřene zralými mastocyty, zejména ve spojení s eosinofilií, se vyskytuje spíše u onemocnění, jako jsou myeloidní/lymfoidní neoplázie spojené s mutacemi PDGFR A a B. Mezi tzv. vedlejší kritéria patří i mutace c-kit.

Klasifikace WHO rozlišuje s ohledem na nádorovou nálož, symptomy a prognózu 5 základních základních typů SM:

- Indolentní SM (ISM): nepřítomnost C symptomu, nepřítomnost jiné hematologické neoplázie, nízká nádorová nálož.

- Doutnající SM (smoldering SM= SSM): nepřítomnost C symptomu, nepřítomnost jiné hematologické neoplázie,  $\geq 2$  B symptomy.
- Agresivní SM (ASM): přítomnost alespoň jednoho C symptomu.
- SM asociovaná s jinou hematologickou neoplázií (SM-AHN).
- Mastocelulární leukémie (MCL).

## TERAPIE A PROGNÓZA SYSTÉMOVÉ MASTOCYTÓZY

Společnou terapií všech forem SM je prevence a léčba mediátorového syndromu. Preventivně používáme kombinaci H1 a H2 blokátorů, například ranitidin (famotidin) s cetirizinem. Pacientům s dominujícími abdominálními kolikami a průjmy jsme doporučovali dinatrium-chromoglykát (v ČR ale již není dostupný). Pro případ anafylaxe mají pacienti u sebe balíček s autoinjktorem adrenalinu (např. EPIPEN®), musí být, ale edukováni v jeho aplikaci. U špatně zvladatelných symptomů používáme s dobrým efektem kortikosteroidy, jejich dlouhodobé užívání však není žádoucí. Pacientům doporučujeme neužívat potraviny s vysokým obsahem histaminu, jako jsou ryby, tzv. modré zrající sýry apod., a alkohol (zejména červené víno), který může také spustit mediátorovou reakci. Z léků nedoporučujeme kys. acetylsalicylovou, i když u některých pacientů může vést paradoxně k úlevě od některých symptomů, zejména při flush. Také další NSAID mohou způsobit uvolnění mediátorů u SM.

## LÉČBA ISM A SSM

U indolentní SM a stabilních indolentně probíhajících forem SSM není nutné zahajovat specifickou cytoredukční léčbu. Zahajujeme ji však tam, kde dochází opakovaně k život ohrožujícím epizodám anafylaxe nebo u těch pacientů, kteří mají díky dalším mediátorovým symptomům špatnou kvalitu života (např. těžký pruritus, poruchy spánku a deprese, časté abdominální koliky s imperativními průjmy a zvracením apod.) nebo tam, kde jsme nuceni indikovat kortiko-

steroidy s nemožností jejich časného vysazení. Lékem volby je v tomto případě interferon- $\alpha$  nebo kladribin (2-chlordeoxyadenosin). V případě interferonu- $\alpha$  eskalujeme postupně dávku z 3 mil. j. 3x týdně až dojde ke znatelnému efektu, za maximální dávku pro SM považujeme 5 mil. j. denně. Léčba by měla trvat alespoň 6–12 měsíců, kromě obvyklých vedlejších účinků interferonu- $\alpha$  je třeba bedlivě sledovat zejména event. rozvoj depresivní poruchy. Kladribin podáváme v dávce 0,14 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 5 dní v intervalu 4–6 týdnů, obvykle podáváme celkem 6 cyklů. Cyto-redukční léčbu je vhodné při zahájení překrýt 1–2 týdny kortikosteroidy jako prevenci náhlého vyplavení mediátorů. Tam, kde nebyl interferon- $\alpha$  dostatečně účinný, můžeme v druhé linii indikovat kladribin a naopak.

Tyrozinkinázové inhibitory (TKI) imatinib, nilotinib a dasatinib byly zkoušeny u SM s hraničním efektem u početně omezených skupin pacientů. Obecně lze říci, že dosud registrované TKI by měly být zváženy u pacientů s ISM ve třetí, resp. další linii léčby, největší odpověď lze čekat u pacientů bez c-kit D816V, indikace těchto TKI je však off-label s ne příliš velkou literární podporou.

Podle dostupných údajů není přežití pacientů s ISM rozdílné od délky života v běžné populaci, nicméně neléčení pacienti s těžkými anafylaktickými záchvaty mohou mít větší riziko předčasného úmrtí.

## LÉČBA ASM

U pacientů s agresivní SM indikujeme cytoredukční terapii co nejdříve po stanovení diagnózy. V první linii upřednostňujeme spíše kladribin ve stejném dávkovém schématu jako byl popsán u ISM, zejména u pacientů s organomegalií a lymfadenopatií. Odpověď na léčbu má více než 50 % pacientů, jen vzácně však dojde k navození kompletní remise. U pacientů s ASM bez prokázané mutace c-kit D816V lze doporučit i v 1. linii imatinib. Nilotinob ani dasatinib u ASM neprokázaly významný efekt. Naproti tomu

**Tab. 1. Kritéria pro diagnózu a typ systémové mastocytózy.**

### A. Diagnostická kritéria\*

1. Hlavní kritérium: multifokální infiltráty MC s vysokou denzitou ( $\geq 15$  mastocytů v agregátech) v histologii KD nebo jiného extrakutánního orgánu.
2. Vedlejší kritéria:
  - a) atypická morfolgie MC ( $> 25$  % MC, nejčastěji vřetenovitý charakter) v histologii KD nebo jiného extrakutánního orgánu nebo atypická nebo nezralá morfolgie MC v nátěru aspirátu KD.
  - b) detekce aktivující mutace v kodonu 816 KIT v KD, nebo krvi nebo jiném extrakutánním orgánu.
  - c) Koexprese CD2 a/nebo CD25 s CD117 na MC v kostní dřeni, krvi nebo jiném extrakutánním orgánu.
  - d) trvalé zvýšení hladiny sérové tryptázy  $>20$  ng/ml s výjimkou SM-AHN.

### B. kritéria pokročilosti (B symptomy)

1. Infiltrace KD mastocyty  $> 30$  % (fokální, denzní agregáty) nebo sérová tryptáza  $> 200$  ng/ml.
2. Známký dysplázie nebo myeloproliferace v nemastocytární hematopoetické linii KD, ale nepostačující pro dg. klonálního hematologického onemocnění (SM-AND), s normálním nebo lehce atypickým KO.
3. Hepatomegalie bez alterace jaterní funkce nebo palpačně zvětšená slezina bez projevu hypersplenismu nebo lymfadenopatie zjištěná palpačně nebo zobrazovací metodou.

### C. kritéria pokročilosti (C symptomy)

1. Insuficience KD (ANC  $< 1,0 \times 10^9/l$  nebo HGB  $< 100 \times 10^9/l$  nebo PLT  $< 100 \times 10^9/l$ ) bez známek asociovaného nemastocytárního hematologického onemocnění (AHN).
2. Palpovatelná hepatomegalie s postižením jaterní funkce, ascites nebo jiné známky portální hypertenze.
3. Palpovatelná splenomegalie se známkami hypersplenismu.
4. Malabsorbce s váhovým úbytkem při infiltraci GIT mastocyty.
5. Osteolytická ložiska v kostech nebo těžká osteoporóza způsobující patologické fraktury.

\* Pro stanovení diagnózy SM je nutné splnit hlavní kritérium a jedno vedlejší nebo alespoň 3 vedlejší kritéria. MC: mastocyty, KD: kostní dřeň.

midostaurin, další „multiinhibitor“ tyrozin kináz namířený proti FLT3, PDGFR a VEGFR prokázal efekt jak u „wild-type“ C-KIT, tak u mutace D816V. V klinické studii fáze 2, kam byli zahrnuti také pacienti s ASM, SM-AHN a MCL, došlo po midostaurinu u ASM k navození odpovědi celkem u 75 % pacientů, medián trvání u této skupiny pacientů nebyl dosažen. Midostaurin je v ČR dostupný v přípravku Rydapt<sup>®</sup>, jeho úhrada u SM podléhá schválení revizního lékaře zdravotní pojišťovny. U pacientů s ASM, kteří neodpovídají na terapii 1., resp. 2. linie, nebo je odpověď krátká, je třeba zvážit alogenní transplantaci krvetvorných buněk (HSCT), která je zatím jedinou kurativní metodou. Dat o efektu alogenní HSCT

u ASM je nicméně málo, jedním z nich je dosažení kompletní remise a 3leté přežití: 43 %.

Aby byl výčet léčebných modalit u ASM kompletní, je nutno zmínit také radioterapii. Ta je s dobrým efektem používána v rámci paliativního přístupu u pacientů s jinak nevladatelnou bolestí při ložiskovém kostním postižení.

Obecně je přežití pacientů s ASM výrazně kratší než délka života dané populace, údaje o přežití ASM variabilní a jsou v mezích 3,5–7 let.

## LÉČBA SM-AHN

Léčba systémové mastocytózy asociované s jinou hematologickou neoplazií je z pohledu SM jednoduchá: domi-

nující je terapie daného AHN, nejčastěji jde o Ph negativní myeloproliferativní onemocnění (MPN), CMML, MDS a AML. V tomto pořadí se také postupně zhoršuje prognóza pacientů se SM-AHN, která je spojena s mediánem celkového přežití 2–4,4 roky. Akutní myeloidní leukémie má tedy ve spojení se SM horší prognózu než bez SM. Kurativním přístupem v této prognosticky nepříznivé skupině může být alogenní HSCT. U pacientů s maligní lymfoproliferací (ML) a SM je také léčba zaměřena na lymfoproliferaci, údaje o prognostickém vlivu SM na osud ML nejsou známy

## LÉČBA MCL

Mastocelární leukémie je velmi vzácné fulminantní onemocnění s mediánem přežití zhruba 6 měsíců. Určitý efekt prokázala u jednoho pacienta kombinovaná chemoterapie FLAG (fludarabin, vysoká dávka ARA-C a G-CSF). Po alogenní transplantaci kostní dřeně bylo 50 % pacientů rezistentních nebo časně zrelabovali. Určitou nadějí pro pacienty s MCL by mohl být midostaurin.

## Literatura

1. Bibi S, Langenfeld F, Jeanningros S, et al. Molecular defects in mastocytosis: KIT and be-

yond KIT. *Immunol Allergy Clin North Am* 2014;34:239–262.

2. Cohen SS, Skovbo S, Vestergaard H, et al. Epidemiology of systemic mastocytosis in Denmark. *Br J Haematol* 2014;166:521–528.

3. Castells M, Austen KF. Mastocytosis: mediator-related signs and symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:147–152.

4. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2021 Update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol* 2021;96:508–525.

5. Gotlib J, Kluijn-Nelemans H, George T, et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med* 2016;374:2530–2541.

6. Ustun C, Reiter A, Scott BL, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for advanced systemic mastocytosis. *J Clin Oncol* 2014;32:3264–3274.

## AL amyloidóza

Pika T.

Hematoonkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Amyloidózy tvoří poměrně heterogenní skupinu onemocnění, jejichž společným rysem je ukládání amyloidu – insolubilního bílkovinného materiálu fibrilárního charakteru. Amyloid je extracelulárně depozován v tkáních, což vede k jejich dezorganizaci a následné funkční poruše. Doposud bylo identifikováno více než 30 různých amyloidogenních proteinů. V zásadě rozlišujeme amyloidózu dle rozsahu postižení na systémovou a lokalizovanou, dle charakteru přenosu pak na získané a hereditární typy. AL amyloidóza (*light chain*) je systémové nebo orgánově limitované onemocnění patřící do skupiny monoklonálních gamapatií, resp. plazmocelulárních dyskrázií. Jedná se o méně obvyklé onemocnění a incidence je přibližně 5–12 nemocných na milion obyvatel za rok, představuje však více než 70 % případů ze všech typů amyloidóz. Onemocnění je charakterizované depozicí fibril tvořených fragmenty nebo kompletními molekulami monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinu produkovaných klonální plazmocelulární po-

puací. Imbibice tkání amyloidem má za následek progredující postižení orgánů – nejčastěji ledvin, srdce, jater a periferního nervového systému. V naprosté většině případů bývá u nemocných zjevně multiorgánové postižení.

Diagnostika AL amyloidózy zahrnuje komplexní vyšetření zahrnující průkaz monoklonálního imunoglobulinu v séru a/nebo v moči či strukturálních podjednotek – volných lehkých řetězců imunoglobulinu, průkaz produkujícího B-buněčného klonu (klonální plazmocyty ev. vyloučení asociace s mnohočetným myelomem, Waldenströmovou makroglobulinémií či jinou B-lymfoproliferací) a orgánový screening (echokardiografie ev. MR srdce, UZ ledvin a jater, stanovení proteinurie, kardiomarkerů (troponin, natriuretické peptidy) a aktivity alkalické fosfatázy). Nezbytností je bioptický odběr tkáně s histologickým průkazem (barvení Konžskou červení) a následnou typizací amyloidových mas (imunofluorescence, imunohistochemie, hmotnostní spektrometrie).

Stratifikaci nemocných do jisté míry umožňuje stážovací systém Mayo clinic, který má nejen prognostický význam, ale napomáhá rovněž ve výběru vhodné terapie.

Léčba AL amyloidózy je přísně individuální s volbou terapie s ohledem na věk, komorbiditu a pokročilost orgánového postižení. Eliminace B-lymfocytárního klonu a redukce nálože amyloidogenních lehkých řetězců (tedy dosažení hematologické remise) je podmínkou k dosažení orgánové léčebné odpovědi, a tím i delšího přežití nemocných. Doposud nejúčinnější léčebnou modalitu pro nemocné s AL amyloidózou představuje terapie vysokodávkovaným melfalanem s podporou autologního štěpu, které může předcházet 3–4měsíční indukční terapii. Tato léčebná modalita je spojena s vysokým procentem dosažených remisí, ale vzhledem k častému vyššímu věku nemocných, orgánovému postižení a dalším komorbiditám lze tuto terapii poskytnout pouze asi 20 % pacientů. V současnosti jsou definována

kritéria umožňující posoudit bezpečnou indikaci této léčby. Vysokodávková terapie je spojena s dosažením hematologické odpovědi u více než 70 % nemocných. Jako indukční terapie bývá obvykle užíván režim CyBorD (bortezomib, cyklofosfamidem, dexametazonem). Konvenční terapii u netransplantabilních nemocných představuje režim kombinující melfalan s dexametazonem (MDex), u nemocných s absencí translokace t(11;14) či velkou náloží monoklonálních lehkých řetězců navíc v kombinaci s bortezomibem (BMDex). Touto léčbou bývá dosaženo hematologické léčebné odpovědi přibližně u 56, resp. 81 % nemocných při relativně dobré toleranci léčby. V současné době je řada prací dokladující efektivní terapii nemocných s AL amyloidózou novými léky s biologickým účinkem ze skupiny IMiDů (lenalidomid, pomalidomid) či nových

inhibitorů proteazomu (karfilzomib, ixazomib). Tyto léky bývají užívány u relabujících nemocných či u nemocných rezistentních na terapii bortezomibem.

V současné době se do popředí dostává také léčba anti-CD38 protilátkou daratumumabem, která byla u nemocných s AL amyloidózou v rámci klinických studií využívána v monoterapii i v kombinovaných schématech, a to jak u nově diagnostikovaných nemocných, tak u pacientů s relabujícím onemocněním. Léčba je u většiny pacientů spojena s vysokým procentem hematologických, ale i orgánových odpovědí při velmi dobré toleranci. V současnosti probíhají klinické studie testující terapeutické použití protilátek vůči amyloidovým depozitům v tkáních. Nedílnou součástí léčby je podpůrná terapie cílená na zlepšení či náhradu funkce postižených orgánů, nezbytná je meziob-

rová spolupráce. Přísně individuálně lze zvážit orgánovou transplantaci u mladších nemocných s významným izolovaným orgánovým postižením, zejména srdce.

### Literatura

- Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN et al. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid* 2014;21(4):221–224.
- Pika T, Hájek R, Adam Z et al. Diagnostika a léčba systémové AL amyloidózy. *Transfuzie Hematol. dnes* 2019;25Suppl.1:37–71.
- Gavriatopoulou M, Musto P, Caers J et al. European myeloma network recommendations on diagnosis and management of patients with rare plasma cell dyscrasias. *Leukemia* 2018;32:1883–1898.
- Palladini G, Merlini G. What is new in diagnosis and management of light chain amyloidosis? *Blood* 2016;128(2):159–168.
- Sidiqi MH, Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis diagnosis and treatment algorithm 2021. *Blood Cancer J* 2021;11:90.

## Waldenströмова makroglobulinémie v roce 2021

Kaščák M.

*Klinika hematologické FN Ostrava*

Waldenströмова makroglobulinémie (WM) je vzácným onemocněním charakterizovaným infiltrací kostní dřeně buňkami lymfoplazmocytárního lymfomu (LPL) s produkcí monoklonálního imunoglobulinu (IgM) třídy IgM [1]. Svým biologickým chováním je sice blízká indolentním B-lymfomům, unikátní biochemické a imunologické vlastnosti molekuly IgM ale způsobují pestrou škálu jedinečných projevů. Mimo známé projevy, jako jsou hyperviskózní syndrom, kryoglobulinémie a nemoc chladových aglutininů, může WM provázet i sekundární amyloidóza, infiltrace CNS popisována jako Bing-Neelův syndrom nebo různorodé formy získané neuropatie (typicky navozená protilátkami proti glykoproteinu asociovanému s myelinem,

takzvaná anti-MAG neuropatie). Málo známá je i sekundární forma sideropnické anémie navozená zvýšenou produkcí hepcidinu buňkami LPL [2]. WM byla dlouhodobě všeobecně vnímaná jako onemocnění na pomezí lymfoproliferativní nemoci a plazmocelulární dyskrázie a v léčbě byly ještě donedávna využívány léčebné protokoly pro pacienty s lymfomy a myelomem. V posledních 10 letech ale došlo k dramatickému rozvoji znalostí jak v rovině diagnostické, tak terapeutické.

Co se týče diagnostiky, standardem zůstává imunohistochemické vyšetření biopsie kostní dřeně. Klíčovou diagnostickou metodou je vyšetření kostní dřeně pomocí multiparametrické průtokové cytometrie (IFCM). Zásadní v této

oblasti byla práce skupiny Paiva et al. [3], která vedla k odhalení charakteristického imunofenotypu B-buněk u WM. Unikátní imunofenotyp CD22<sup>low</sup>/CD23<sup>neg</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>/sIgM<sup>+</sup> a typická negativita antigenů CD5/CD10/CD11c a CD103 pomáhá odlišit WM od jiných B-lymfoproliferací či raritní jednotky IgM mnohočetného myelomu. Navíc znalost imunofenotypu poslouží do budoucna ke sledování minimální reziduální nemoci. Nejvýznamnějším milníkem bylo odhalení aktivační mutace L265P v genu MYD88 (záměna aminokyseliny leucinu za prolin na pozici 265) pomocí metod celogenomového sekvenování u pacientů s WM a monoklonální gamapatií IgM (IgM MGUS) v roce 2012. Tato mutace se vyskytuje u > 50 % pacientů

s IgM MGUS a > 90 % pacientů s WM [4]. Při znalosti nízkého výskytu mutace *MYD88* u jiných indolentních B-lymfomů (například kolem 10 % u lymfomů marginální zóny) a 0 % výskytu u myelomu se stala silným nástrojem v diferenciální diagnostice. Somatické mutace v genu *CXCR4* jsou přítomny u 30 % pacientů s WM a řadí se frekvencí na druhé místo po mutacích v genu *MYD88* [5]. Aktivační mutace genu *CXCR4* u WM jsou podobné vrozeným mutacím zárodečných buněk u pacientů s kongenitálním primárním imunitním deficitem, WHIM syndromem (na chromozom X vázaná chronická necyklická neutropenie, bradavice a hypogamaglobulinémie). Pomocí běžně dostupné metody polymerázové řetězové reakce vyšetřujeme v klinické praxi přítomnost mutací v genu *MYD88* tak *CXCR4* u pacientů jak z kostní dřeně, tak periferní krve či mozkomíšního moku [6].

Obdobně jako diagnostika WM i léčba doznala obrovského pokroku. Jedná se sice nadále o nevléčitelné onemocnění, ale obvykle s dlouhým bezpříznakovým obdobím a příznivou prognózou. Úmrtnost u asymptomatických nemocných je prakticky identická z úmrtností v obecné populaci. Léčba je iniciována s objevením klinických příznaků a/nebo po splnění kategorických kritérií. Anti-CD20 monoklonální protilátka rituximab a její kombinace tvoří nadále základní pilíř léčby. Upřednostňovány jsou protokoly s co největší bezpečností. Hlavním cílem je dlouhodobá kontrola nemoci se zachováním kvality života při toxicitě. Zcela nevhodné jsou režimy obsahující vinka alkaloidy, antiracykliny nebo purinové analoga, a to zejména v primoléčbě. Preferovaná je kombinace rituximabu s cyklofosfamidem a dexametazonem (DRC) nebo s bendamustinem (BR). Pomocí zmiňovaných dobře tolerovaných režimů lze navodit remisi v trvání 3–6 let [7]. V případě symptomatického relapsu po více než 2 letech od iniciální léčby lze zvážit stejný režim. Vybraným mladším nemocným lze nabídnout vysokodávkovanou

chemoterapii s autologní transplantací krvetvorby [2].

Nejvýznamnějším léčebným posunem u WM byla registrace inhibitoru Brutonovy tyrozinkinázy první generace, ibrutinibu. Ibrutinib představuje ve více než 70leté historii Waldenströmovy makroglobulinémie vůbec první lék schválený přímo pro toto onemocnění. Tato léčba je dostupná i v České republice po předchozím schválení revizním lékařem. Podkladem ke klinickému testování ibrutinibu u WM bylo odhalení molekulárního mechanismu – mutovaná forma adaptorové molekuly *MYD88* vede v nádorových buňkách WM k aktivaci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B, pomocí interleukin-1 asociovaných kináz (IRAK1 a IRAK4) a prostřednictvím Brutonovy tyrosinkinázy (BTK). Inhibice enzymu BTK zastavuje maligní růst *MYD88* mutovaných nádorových linií a vede k jejich apoptóze [8]. V registrační klinické studii, fáze II u dříve léčených pacientů s WM bylo pomocí ibrutinibu v dávce 420 mg/den dosaženo > 90 % celkových léčebných odpovědí, z toho 79 % velkých léčebných odpovědí (PR a lepší). Léčebné odpovědi nebyly ovlivněné žádným z obvyklých negativních prognostických ukazatelů jako vyšší věk, horší biologický stav, vyšší riziko podle mezinárodního prognostického ukazatele, mírou infiltrace kostní dřeně či počtem předchozích linií. Mutační status genů *MYD88* (*L265P* mutace versus nemutovaný) a *CXCR4* (WHIM mutace versus nemutovaný) měl nicméně statisticky významný vliv na léčebnou odpověď. Nejlepší léčebné odpovědi dosáhla skupina pacientů s genotypem *MYD88L265P / CXCR4* nemutovaný. Nejhorší výsledky byly ve skupině genotypu *MYD88* nemutovaný / *CXCR4* nemutovaný. Podle finální analýzy studie z roku 2021 byl při mediáně sledování 59 měsíců, nebyl medián 5letého přežití bez progresu (PFS) dosažen pro celou skupinu léčených (54 %) a byl 70 % pro pacienty s genotypem *MYD88* mutovaný / *CXCR4* nemutovaný a 38 % pro genotyp *MYD88* mutovaný / *CXCR4* mutovaný.

U pacientů s nemutovaným *MYD88* byl medián PFS jenom 0,4 roku. 5leté celkové přežití bylo pro celou skupinu 87 % [4]. Stanovením genotypu u WM lze tedy předvídat účinnost léčby ibrutinibem. Negativní prognostický dopad nemutovaného genu *MYD88* u WM při monoterapii ibrutinibem může podle randomizované klinické studie INNOVATE překonat jeho kombinace s rituximabem [9]. Na významné úspěchy ibrutinibu u WM navazuje druhá generace BTK inhibitorů s menší off-target aktivitou a lepším profilem nežádoucích účinků. Další účinné, ale neregistrované léky v léčbě relabované/refrakterní WM představují inhibitory proteazomu bortezomib, carfilzomib a ixazomib v kombinaci s glukokortikoidy a rituximabem, z imunomodulačních léků lenalidomid a z cílených inhibitorů PI3k inhibitor idealisib v kombinaci s obinutuzabem. Velmi perspektivní se u WM zdá být inhibice BCL-2 pomocí venetoclaxu a léčba pomocí anti-CD38 monoklonální protilátky daratumumabu. V běhu jsou dále studie s inhibitory *CXCR4* jako dalším molekulárním cílem [10].

Prostřednictvím české myelomové skupiny byla zahájena úspěšná spolupráce s Evropským konsorciem pro WM (ECWM). Mimo jiné aktivity se vybraná centra v České republice podílela na jedné z největších klinických studií u WM – akademické multicentrické mezinárodní randomizované klinické studii fáze 3, ECWM-1, zkoumající kombinaci DRC s přidáním bortezomibu proti standardní léčbě DRC. V letošním roce bude zahájena další společná multicentrická klinická randomizovaná studie CZAR-1 zkoumající přidání carfilzomibu k ibrutinibu. Tyto klíčové aktivity posouvají léčbu WM v České republice na mezinárodní úroveň.

## Literatura

- Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al. Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003;30:110–115.

2. Kaščák M, Hájek R, Minařík J, et al. Diagnostika a léčba Waldenströmovy makroglobulinemie. Diagnostika a léčba systémové AL amyloidózy: Doporučení vypracovaná Českou myelomovou skupinou, Myelomovou sekcí České hematologické společnosti, Kooperativní lymfomovou skupinou, Lymfomovou sekcí České hematologické společnosti. *Transfuzie a hematologie dnes* 2019;19(Supplementum 1):71.
3. Paiva B, Montes M, García-Sanz R, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia* 2014;166–173. doi: 10.1038/leu.2013.124.
4. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. *MYD88 L265P* somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012;367(9):826–833.
5. Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring *MYD88* and WHIM-like *CXCR4* mutations, and small static deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 2014;123(11):1637–1646.
6. Growkova K, Kufová Z, Sevcikova T, et al. Diagnostic tools of Waldenströms macroglobulinemia – best possibilities for non-invasive and long-term disease monitoring. *Klin Onkol.* 2017;30(Supplementum2):81–91. doi: 10.14735/amko20172581.
7. Kaščák M, Kufová Z, Growková K a Hájek R. Waldenströmová makroglobulinémie v roce 2016: optimalizace imunochemoterapie s cílem minimalizace nežádoucích účinků. *Onkologia pre prax.* 2016;2016(5):291–295.
8. Treon SP, Meid K, Gustine J, et al. Long-term follow-up of ibrutinib monotherapy in symptomatic, previously treated patients with Waldenström macroglobulinemia. *J Clin Oncol.* 2021;39(6):565–575. doi: 10.1200/JCO.20.00555.
9. Trotman et al. 2020 Long-term follow-up of ibrutinib treatment for rituximab-refractory Waldenström's macroglobulinemia: final analysis of the open-label substudy of the Phase 3 iINNOVATETM Trial, ASH 2020.
10. Kaiser LM, Hunter ZR, Treon SP, et al. *CXCR4* in Waldenström's Macroglobulinemia: chances and challenges. *Leukemia* 2021;35:333–345. doi: 10.1038/s41375-020-01102-3.

## Histiocytóza z Langerhansových buněk

Adam Z.

Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

Histiocytóza z Langerhansových buněk (LCH) je histopatologická jednotka s velmi širokým spektrem forem klinických projevů. Lze říci, že tato nemoc je schopna svými příznaky a projevy imitovat četné jiné nemoci, od nichž bez histologického vyšetření není odlišitelná.

U dospělých je incidence 1–2 případy/1 mil obyvatel, takže v ČR by ročně mělo být diagnostikováno 10–20 nových případů. Při analýze projevů této nemoci u dospělých byly získány následující údaje: v 80 % bývají postiženy kosti, v 60 % kůže, ve 33 % játra, slezina a uzliny, ve 30 % kostní dřev, ve 25 % plíce, ve 25 % orbita, ve 20 % ucho a orodentální oblast, kde nemoc může zapříčinit uvolňování zubů.

Průběh je u dospělých velmi různorodý. U některých postihne jenom jedno ložisko a po léčbě se již neobjeví, u jiných má recidivující charakter, objevují se stále nová a nová ložiska a choroba může být příčinou omezené hybnosti či může dokonce přivodit smrt.

### KLINICKÉ PROJEVY

#### Kostní projevy LCH

Histiocytóza z Langerhansových buněk v dospělosti postihuje dominantně skelet, vytváří osteolytická ložiska podobná osteolýze při mnohočetném myelomu. Nejčastěji je uváděno postižení kalvy, následuje pak osteolytické postižení žeber. U některých pacientů jsou kostní ložiska různého stáří, hojící se místa mají sklerotický lem. Všechna ložiska nemusí bolet. Zduření tkání přiléhajících ke kosti signalizuje, že choroba prorůstá do okolí a mnohdy až zduření nad kostí upozorní na přítomnost kostního ložiska. Kostní ložiska často způsobují zvýšený kostní obrat, a proto jsou znázornitelná metodou scintigrafie skeletu pomocí technecium-pyrofosfátu. Znázornění metodou FDG-PET/CT má výhodu v zachycení i mimokostních ložisek, proto ji preferujeme. FDG-PET/CT zobrazení vypovídá o aktivitě či neaktivitě ložiska a může pomoci při plánování radioterapie a vyhodnocování léčebné odpovědi. Za zvláště rizikové kostní lokalizace jsou považovány kostní defekty v oblasti orbitální se

supraorbitálními infiltráty a obecně postižení obličejových kostí. Uvedené postižení bývá s vyšší pravděpodobností provázeno pozdějším postižením CNS.

#### Kožní projevy LCH

Infiltrace kůže buňkami Langerhansovy histiocytózy často postihuje intertriginózní oblasti (perianální oblast, vulva, třísla, pupek). Papulózní projevy jsou často hodnoceny jako nespecifické či ekzémové. Šupíci plošky jsou zaměňovány se seborrhoickou dermatitidou, zvláště u kojenců a malých dětí při postižení vlasaté části hlavy. To, že jde o kožní projev LCH, nelze obvykle rozpoznat při makroskopickém pohledu, ale pro rozpoznání je potřeba provést excisi a histologické hodnocení vzorku. Proto také dermatolog St Claire nazval tuto chorobu velkým imitátorem.

#### Plicní projevy LCH

Radiografický nález je tvořen cystami a intersticiálními nodulárními opacitami uloženými obvykle blíže hilům, obraz je viditelný pouze při HRCT zobrazení plic,

není zřetelný na běžném rentgenovém snímku.

Z hlediska léčby je zásadní dělení na izolovanou primárně plicní formu LCH a na plicní postižení v rámci generalizované formy LCH.

Izolovaná plicní forma LCH je relativně častá u kuřáků a analýza klonality zde prokázala polyklonální proliferaci, zatímco plicní postižení při generalizované formě LCH vykazuje známky klonality. Izolovaná plicní forma LCH se považuje za reaktivní proces reagující na kouření či jiné stimuly. U této formy bylo také potvrzeno, že v případech pacientů se silnou vůlí, kteří dokázali přestat kouřit, došlo dle zobrazovacích a funkčních vyšetření k spontánní regresi nemoci.

Pokud však jde o plicní formu navazující na generalizované postižení skeletu a dalších orgánů, tak je průběh relativně nepříznivý a je indikována systémová léčba,

Pro sledování plicní formy jsme zavedli tým docenta Zdeňka Řeháka z Masarykova onkologického ústavu pro speciální hodnocení pomocí FDG-PET/CT s měřením difúzní akumulace FDG v plicích.

### Endokrinní a mozkové projevy LCH

Diabetes insipidus je nejčastější hormonální komplikací LCH, jeho manifestace může být prvním příznakem nemoci v dospělosti anebo se může rozvinout v průběhu choroby. Diabetes insipidus bývá prokázán až u 30 % dospělých pacientů v průběhu LCH a v případně multisystémového postižení se vyskytuje v 40 %.

Po dlouhém průběhu nemoci se objevují neurodegenerativní ložiska postrádající CD1a+ buňky. Nejčastěji bývá postiženo cerebellum, nucleus dentatus, cerebellární bílá hmota a mozkový kmen s výraznou zánětlivou infiltrací, obsahující CD8 lymfocyty. Tento proces vede k degeneraci a glióze nervové tkáně.

Za základní endokrinní vyšetření se proto pro všechny pacienty s LCH považuje vyšetření TSH T4 a osmolarity ranní moče. V případě podezření na endokrinní postižení se pak dopl-

ňují další testy, vodní deprivací testy, vyšetření osmolality plazmy, vyšetření sérového kortizolu, růstového faktoru, gonadálních steroidních hormonů a gonadotropinu.

### Lymfadenopatie na podkladě LCH

Histiocytóza obvykle nedělá výraznou lymfadenopatii. Pokud ano, jde spíše o ložiskové než generalizované postižení. U našich pacientů jsme se setkali jak s případem lokalizované lymfadenopatie, kterou vyléčil operační výkon, tak s případem generalizované lymfadenopatie, která měla stejný obraz při PET/CT zobrazení jako generalizovaný ne Hodgkinův lymfom.

### Ušní projevy LCH

Poruchy sluchu mohou nastat jak postižením zevního sluchového kanálu, tak poruchou středního či vnitřního ucha propagací choroby z processus mastoideus. Infiltrace je nebolestivá a postupně vede k hluchotě. Časté jsou sekundární infekce, které jsou příčinou záměny za chronickou otitidu. Proto by u každé dlouhodobé afekce, připomínající zánět zevního zvukovodu, mělo být histologicky ověřeno, zda se nejedná o první projev LCH. Nemoc totiž dále progreduje do vnitřního ucha a bohužel je často diagnostikovaná až při operaci kvůli procesu, který destruuje celé vnitřní ucho.

### Postižení jater a sleziny LCH

Játra i slezina mohou být touto chorobou také postižena, což se projeví jejich zvětšením. Infiltrace jater může vyvolat příznaky jaterního selhání (pokles koncentrace albuminu, snížení aktivity koagulačních faktorů, žloutenka bez výrazného zvýšení jaterních enzymů). U chronických forem může vzniknout periportální fibrotizace s příznaky shodnými se sklerotizující cholangitidou a obstrukční biliární žloutenkou, kterou je nutno na základě biopsie odlišit od primární sklerotizující cholangitidy a adekvátně léčit.

### Postižení dutiny ústní LCH

Počínající infiltrace se v dutině ústní projevuje zduřením dásní a sliznice patra. Může dojít i k postižení kostí a uvolňování zubů či hypertrofii dásní. Progrese infiltrátů pak vytváří ulcerace v ústech. Někdy je projev LCH v ústech bez histologie nerozeznatelný od paradentózy, projevuje se zánětem dásní, a někdy proces přechází i na kostní strukturu čelisti. Toto postižení ilustruje snímek dutiny ústní dospělého člověka. Diagnostické je až histologické vyšetření. Gingivální postižení je často spojeno s postižením alveolární části čelisti a ztrátou zubů. V případně uvolnění zubů se tyto zuby nemají extrahovat, protože pokud se však včas zahájí léčba, je možné opětovné zpevnění zubního lůžka.

## LÉČBA HISTIOCYTÓZY Z LANGERHANSOVÝCH BUNĚK

### Léčba kostního postižení

- Zde se používají tyto alternativy: Biopsie s kyretáží ložiska. Kompletní excize kostního ložiska se nepovažuje za indikovanou, protože tento způsob by způsobil velký a nehojící se kostní defekt a mrzačil by člověka.
- Nitroložisková injekce kortikoidů. Metylprednisolon v dávce 40–160 mg urychlí hojení.
- Cílená radioterapie je indikována.
- V případě multifokálního postižení nebo při postižení speciálních kostních lokalizací je indikována systémová léčba.

### Léčba izolovaného postižení kůže

- Při limitovaném postižení kůže jsou tyto alternativy.
- Fototerapie, psoralen a ultrafialové záření (PUVA).
- Ozáření nízkými energetickými elektrony – electron beam irradiation.
- Systémová léčba, jak dále uvedeno, případně thalidomid.

### Léčba plicní formy LCH

- Izolovaná, pouze plicní forma: Stop kouření. Pouze v případech, kdy stop

kouření nemá efekt, léčba prednizolem v dávce 1 mg/kg/den po dobu 1 měsíce s následující redukcí dávky v průběhu několika dalších měsíců.

- Pokud jde o postižení plic v rámci systémové formy onemocnění, pak systémová léčba kladribin a jiné. Transplantace plic v případě jinak neřešitelné situace.

### Systémová léčba

- Vinblastin a prednison – historická léčba s prokázaným efektem u dětí. U dospělých nebyl přínos jednoznačně prokázán! Monoterapii kladribinem Lítak s.c. 5 mg/m<sup>2</sup> 5 dní po sobě, případně cytosin-arabosidem ve středních dávkách, či etoposid v monoterapii.
- Intenzivní polychemoterapeutické režimy používané pro lymfomy, obsahující etoposid, například CHOEP, či MA-COB-B. Jsou sice efektivní, ale měly by se používat jen ve vzácných případech agresivních forem LCH.
- Vemurafenib a dabrafenib. V roce 2010 byla u pacientů s LCH prokázána mutace BRAFV600E a při této mutaci lze zvážit vemurafenib, případně nověji dabrafenib.

- Alternativou pro agresivní formy nemoci je také provedení vysokodávkované chemoterapie s autologní či alogenní transplantací kostní dřen.

### Radioterapie

- Není zcela jednotna v doporučené dávce a je poměrně značný rozptyl publikovaných dávek od 1,4 Gy do 45 Gy. Ale obecně je považována za optimální dávka 10–20 Gy pro dospělé a 10 Gy pro děti.

## LÉČBA NEURODEGENERATIVNÍHO ONEMOCNĚNÍ

Názory postupně krystalizují. Není jednoznačné doporučení – IVIGY? Rituximab?

### Literatura

Král Z, Adam Z. a kol. Histiocytární neoplazie a další vybrané velmi vzácné krevní nemoci. Praha: Grada Publishing, 2020. 280 pp. ISBN 978-80-27 978-80-27  
Řehák Z, Koukalová R. Measuring diffuse metabolic activity on FDG-PET/CT: new method for evaluating Langerhans cell histiocytosis activity in pulmonary parenchyma. Nucl Med Biol. 2012;39(3):429–436.

Lorillon G, Tazi A. How I manage pulmonary Langerhans cell histiocytosis. Eur Respir Rev. 2017;26(145):170070. doi: 10.1183/16000617.0070-2017.

Girschikofsky M, Arico M, Castillo D, et al. Management of adult patients with Langerhans cell histiocytosis: recommendations from an expert panel on behalf of Euro-Histio-Net. Orphanet J Rare Dis. 2013;8:72. doi: 10.1186/1750-1172-8-72. 3:

Néel A, Artifoni M, Fontenoy AM, et al. Long-term efficacy and safety of 2CdA (cladribine) in extra-pulmonary adult-onset Langerhans cell histiocytosis: analysis of 23 cases from the French Histiocytosis Group and systematic literature review. Br J Haematol. 2020;189(5):869–878. doi: 10.1111/bjh.16449.

Difloe-Geisert JC, Bernauer SA, et al. Periodontal manifestations of Langerhans cell histiocytosis: a systematic review. Clin Oral Investig. 2021;25(6):3341–3349.

Suh JK, Kang S, Kim H, et al. Recent advances in the understanding of the molecular pathogenesis and targeted therapy options in Langerhans cell histiocytosis. Blood Res. 2021 30;56(S1):S65–S69.

Chen T, Ashman PE, Bojrab DI 2nd, et al. Otolaryngologic manifestations of langerhans cell histiocytosis: a systematic review. Otolaryngol Head Neck Surg. 2021;1945998211004590. doi: 10.1177/01945998211004590.

Angelousi A, Mytareli C, Xekouki P, et al. Diabetes insipidus secondary to sellar/parasellar lesions. J Neuroendocrinol. 2021;33(3):e12954. doi: 10.1111/jne.



# Trombocytopenie: diferenciální diagnostika

Gumulec J.

Klinika hematologie FN Ostrava a LF Ostravské univerzity

## ÚVOD

Počet cirkulujících destiček je výsledkem rovnováhy mezi jejich tvorbou, stárnutím a spotřebou. Ve specifických situacích k poklesu počtu cirkulujících destiček přispívá vystupňované vychytávání destiček ve slezině nebo jejich naředění při masivních transfuzích. Reservoár novotvořených destiček je fragmentovatelný membránový systém zralých megakaryocytů, které vytvářejí dlouhé výběžky vstupující sinusoidami do krve, kde z prominentních částí membrány krevní proud uvolňuje velké množství destiček [1]. Zatímco vyžívání megakaryocytů trvá přibližně 5 dnů, uvolnění destiček do cirkulace jen několik hodin [1]. To je důležité mít na paměti v klinické praxi při hodnocení dynamiky změn počtu destiček po insultech (velké operace etc.), které nepoškozují megakaryopoézu. Nejsou-li destičky spotřebovány v hemostáze nebo při patologických procesech, cirkulují v periferní krvi 7–10 dní a staré elementy zanikají v játrech a/nebo ve slezině.

V každodenní klinické praxi je třeba u pacienta s nově prokázaným snížením počtu destiček nejdříve odpovědět na otázku, jde-li skutečně o trombocytopenii a pokud ano jakou má příčinu a vyžaduje-li urgentní péči.

Počet destiček se u dospělých pohybuje mezi  $150\text{--}400 \times 10^9/l$  bez významných rozdílů mezi muži a ženami. Trombocytopenie znamená pokles počtu cirkulujících destiček pod  $150 \times 10^9/l$ . Není-li nějakým patologickým procesem nebo farmakologicky navozena porucha funkce destiček nebo jinak porušena hemostáza, je trombocytopenie v rozmezí  $50\text{--}150 \times 10^9/l$  vnímána jako bezpečná bez rizika rozvoje hemoragických projevů. V rozmezí  $30\text{--}50 \times 10^9/l$  může po poškození integrity tkání nebo

při antitrombotické terapii docházet ke krvácení. Spontánní krvácivé projevy se objevují je-li počet destiček pod  $20\text{--}30 \times 10^9/l$  [2].

Od skutečné trombocytopenie je třeba odlišit artefakt nazývaný pseudotrombocytopenie, kdy je nízký počet destiček zjištěný ve vzorku odebrané krve falešný a počet cirkulujících destiček je v referenčním rozmezí.

V různých skupinách dospělých pacientů bývají rozdíly v etiopatogeneze nově vzniklé trombocytopenie. Jiné mechanismy vedoucí k poklesu počtu destiček převažují u kriticky nemocných pacientů vyžadujících intenzivní péči, jiné u gravidních žen a jiné u stabilních ambulantních pacientů. Přestože tato pomůcka v klinické praxi platí, vždy je nutné k diferenciální diagnostice trombocytopenie přistupovat komplexně a s respektem ke skutečnosti, že některé vzácné příčiny trombocytopenie mohou mít, nejsou-li rozpoznány, fatální následky.

## VÍCE ČI MÉNĚ OBECNÁ PRAVIDLA

Z anamnestických dat a z výsledku fyzikálního vyšetření je kromě hemoragických a/nebo trombotických projevů nutné posoudit přítomnost patologických stavů a onemocnění, která mohou být příčinou trombocytopenie (tab. 1).

Z laboratorních vyšetření má zásadní význam vyšetření krevního obrazu s prohlédnutím krevního nátěru (množství, velikost a morfologie destiček, jejich shluky, dřevňové elementy nebo nádorové buňky vyplavované do periferní krve, schistocyty při trombotických mikroangiopatiích, megalocyty při karenci vitamínu B<sub>12</sub> nebo erytroblasty při hemolytické anemii, leukocytární inkluze u onemocnění spojených s MYH9 etc.).

Podezření na pseudotrombocytopenii asociovanou s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) lze potvrdit nebo vyloučit vyšetřením krve nabrané do odběrové zkumavky s alternativním anti-koagulans (citrát, heparin) nebo s přidáním MgSO<sub>4</sub> omezujícím shlukování destiček nebo prohlédnutím nátěru [3].

Vyšetření nezralých destiček poskytuje informaci o dynamice megakaryopoézy a uvolňování destiček do oběhu a z tohoto pohledu může být užitečné v diferenciální diagnostice trombocytopenie (zvýšená hodnota u pacientů s vystupňovanou spotřebou destiček a neporušenou megakaryopoézou vs. nízké hodnoty u pacientů s dřevňovými útlumy).

K rozlišení trombocytopenie z nedostatečné produkce od poklesu počtu destiček z vystupňované spotřeby/destrukce může přispět i hodnocení středního objemu destiček (MPV). Pacienti s vystupňovanou periferní spotřebou/destrukcí destiček mívají větší MPV.

Svízel imunitní trombocytopenie je neexistence specifického konfirmačního testu. Diagnostická nejistota narůstá u pacientů s dalšími příčinami trombocytopenie (infekce, nádor, hepatopatie etc.). V podobných případech může pomoci stanovení destičkových auto-protilátek navázaných na destičky nebo přítomných v plazmě/séru. Cílovým antigenem těchto protilátek bývá destičkový glykoprotein IIb/IIIa a/nebo Ib/IX. Senzitivita testů je sice nízká, ale specifita vysoká. Průkaz auto-protilátek proto může být užitečný pro potvrzení imunitní podstaty trombocytopenie, negativní výsledek testu ale imunitní trombocytopenii nevyloučí.

Průtoková cytometrie má v každodenní rutině diferenciální diagnostiky

**Tab. 1. Diferenciální diagnostika trombocytopenie [2,8].****Jaterní onemocnění vč. cirhózy nebo portální hypertenze****Splenomegalie**

Polékové trombocytopenie (např. heparin, chinin a chinidin, trimetoprim/sulfametoxazol, vankomycin, penicilin, rifampicin, carbamazepin, ceftriaxon, ibuprofen, mirtazapin, oxaliplatin, suramin, abciximab, tirofiban a eptifibatid), užívání alkoholu, toxiny z prostředí, chemoterapie, alemtuzumab, PD-1 inhibitory, valproat, chinin v nápojích

Onemocnění krve a krvetvorby – např. myelodysplastický syndrom, leukémie, solidní nádory (zvláště generalizované), myelofibróza, aplastická anemie, megaloblastová anemie, Gaucherova nemoc

Infekce – virové nebo bakteriální, vč. sepse

Konsumpční koagulopatie – např. diseminovaná intravaskulární koagulopatie, mimotělní oběh

Anamnéza onemocnění, které by mohlo vést i imunitní trombocytopenii (např. infekce jako HIV, HCV, HBV, EBV), autoimunitní onemocnění (např. CVID, SLE nebo APS) nebo nádorová onemocnění (např. lymfocytová leukémie a lymfomy)

Trombotické mikroangiopatie – např. TTP, HUS, HELLP syndrom

Nezádná transfuze (potransfuzní purpura) nebo vakcinace

Vrozené trombocytopenie: TAR syndrom, radioulnární synostóza, kongenitální amegakaryotická trombocytopenie, Wiskott-Aldrich syndrom, onemocnění asociované s MYH9, Bernard-Soulier syndrom, von Willebrandova nemoc typ IIB nebo destičkový typ von Willebrandovy nemoci

PD1 – Programmed Death-1, HIV – Human Immunodeficiency Virus, HCV – virus hepatitidy C, HBV – virus hepatitidy B, EBV – Epstein-Bárové virus, CVID – common variable immunodeficiency, SLE – systémový lupus erythematosus, APS – antifosfolipidový syndrom, TAR – Trombocytopenia and Absent Radius, MYH9 – Myosin Heavy Chain 9, TTP – trombotická trombocytopenická purpura, HUS hemolyticko-uremický syndrom, HELLP – Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet Count

trombocytopenie omezený význam. Užitečná je pro potvrzení hereditární trombocytopenie/patie typu Bernard-Soulier syndrom nebo Glanzmanova trombocytopenie, v rámci diagnostiky heparinem indukované trombocytopenie, pro stanovení retikulovaných destiček, v diagnostice imunitní trombocytopenie.

Nežádoucí účinky léků jsou velmi častou příčinou trombocytopenie. Porucha může být v megakaryopoeze i ve zvýšené periferní spotřebě nebo destrukci cirkulujících destiček. Diagnostickým základem je pečlivý rozbor farmakologické anamnézy nejméně 2–3 týdny do historie. Trombocytopenie u léky indukované imunitní trombocytopenie (DITP) bývá hluboká a může vést k závažným krvácením. Pokles destiček se objevuje po podání léčiva a upravuje se po jeho vysazení. DITP velmi často uniká naší pozornosti, což sebou nese riziko opakovaného výskytu při opakovaném užití

léčiva. Jistotu přináší laboratorní průkaz destičkových protilátek, které se vážou na destičky jen v přítomnosti léčiva. Mezi léky prokazatelně vedoucích k DITP patří chinin a chinidin, trimetoprim/sulfametoxazol, vankomycin, penicilin, rifampicin, carbamazepin, ceftriaxon, ibuprofen, mirtazapin, oxaliplatin, suramin, abciximab, tirofiban a eptifibatid [4]. Patofyziologický mechanismus heparinem indukované trombocytopenie (HIT) je odlišný, manifestuje se především trombotickými projevy, trombocytopenie bývá středně těžká a v případech pozdní manifestace se HIT protilátky mohou manifestovat bez přítomnosti heparinů.

Současný výskyt trombocytopenie a hemolytické anemie nebo hemolýzy bez rozvinuté anemie je výzva k neodkladné diferenciální diagnostice. Klinické a/nebo laboratorní známky rozvíjejícího se poškození tkání a orgánů, zvýšení počtu schistocytů nad 1 % a negativní přímý antiglobu-

linový test (PAT) jsou známky trombotické mikroangiopatie (TMA). Pozitivní PAT u těchto pacientů prokazuje autoimunitní hemolytickou anemii (AIHA) a trombocytopenii – Evansův syndrom. Diagnostické rozpaky zpravidla vznikají u pacientů s PAT negativní autoimunitní hemolýzou (5–10 % všech AIHA).

Antifosfolipidový syndrom (APS) je systémové autoimunitní onemocnění definované trombotickými nebo porodnickými příhodami u pacientů s perzistujícími antifosfolipidovými protilátkami. Trombózy postihují všechny části řečiště. Trombocytopenie patří spolu s postižením srdečních chlopní, livedo reticularis, nefropatií asociovanou s antifosfolipidovými protilátkami, hemolytickou anemií a kognitivní dysfunkcí mezi významné netrombotické projevy APS [5]. Trombocytopenie bývá mírná (nad  $50 \times 10^9/l$ ) a asymptomatická. Při poklesu destiček pod  $20 \times 10^9/l$  je třeba pátrat po jiných příčinách. U pacientů s prudkým průběhem a multiorgánovým postižením je třeba myslet na katastrofický antifosfolipidový syndrom (CAPS) s mortalitou 50 %.

Trombocytopenie je nejčastější hematologický projev chronických hepatopatií. Nelze ji omezovat na zvýšenou sekvestraci destiček ve slezině, uplatňuje se i snížená produkce (u jaterní cirhózy vážne syntéza trombopoetinu, k útlumu megakaryopoezy dochází u virových infekcí, vlivem alkoholu, přetížením železem, nežádoucím účinkem farmak), vystupňovaná destrukce (zvýšené stříhové napětí, hyperfibrinolýza, zvýšená agregace při infekčních komplikacích, imunitně podmíněná destrukce vlivem autoprotilátek – ITP i DITP u hepatopatie) nebo kombinace několika mechanismů. Rozpoznání převažujícího patofyziologického mechanismu má terapeutické konsekvence.

## **NOVĚ VZNIKLÁ TROMBOCYTOPENIE U PACIENTA V HEMATOLOGICKÉ AMBULANCI**

Je-li hematolog např. v rámci konsilia konfrontován s případem pacienta

s nově prokázaným snížením počtu destiček musí nejprve potvrdit, že jde skutečně o trombocytopenii a pokud ano, musí rozhodnout, zdali pacient vyžaduje-li urgentní péči. Velmi dobře musí být hematolog připravený na situace, kdy je konsultován telefonicky a kdy kolega nehematolog na druhé straně telefonní linky naopak úplně dobře připravený není. Nesprávné rozhodnutí o odkladu další diagnostiky může být pro pacienta fatální. Spolehlivé doporučení, který pacient s nově prokázanou trombocytopenií může být bezpečně vyšetřován v ambulanci neexistuje. Určitým vodítkem je celkově stabilní klinický stav pacienta bez krvácivých projevů, s „bezpečným“ počtem destiček s nízkým rizikem krvácení a bez jiných projevů závažného onemocnění. Zodpovědné rozhodnutí ale můžeme udělat až poté, co pacienta sami vyšetříme.

Často je v hematologických ambulancích řešena diferenciální diagnostika trombocytopenie provázející jiná chronická onemocnění nebo trombocytopenie spojené s jinými změnami krevního obrazu, což hematologům diferenciálně diagnostické potíže zpravidla nedělá.

### NOVĚ VZNIKLÁ TROMBOCYTOPENIE U PACIENTA NA JEDNOTCE INTENZIVNÍ PÉČE (JIP)

Trombocytopenie se objevuje až u 50 % kriticky nemocných a u 5–20 % pacientů klesá počet destiček pod  $50 \times 10^9/l$ . Počet destiček typicky klesá během prvních 4 dní po velkých operacích, nadir se zpravidla objevuje 3.–4. pooperační den a spontánní vzestup počtu destiček kolem 5.–7. dne s maximem kolem 14. pooperačního dne [6]. Přetrvávající nebo nově vzniklý významný pokles destiček má velmi pravděpodobně ještě jinou příčinu a predikuje špatnou prognózu. Uplatňovat se může hemodiluce, spotřeba, snížená produkce, sekvestrace, imunitně podmíněná destrukce nebo kombinace. Objevuje se i pseudotrombocytopenie [6]. Identifikace příčiny je zásadní pro strategii péče.

Průkaz pseudotrombocytopenie závislé na EDTA je ve většině případů jednoduchý, problémem může být pseudotrombocytopenie spojená s léčbou antagonisty destičkového glykoproteinu IIb/IIIa (shluky vznikají i v citrátové krvi a tyto léky mohou vést DITP) [2].

Časná potraumatická koagulopatie a hemodiluce navozená masivní transfuzí erytrocytárních přípravků, plazmy, resp. objemovou resuscitací je častou příčinou trombocytopenie [6]. V rámci hematologického konsilia je nezbytné iniciální léčbu pacientů s těžkým traumatem krok za krokem probrat s ošetřujícím lékařem.

K vystupňované spotřebě destiček při hemostáze dochází u nemocných s velkou ztrátou krve (anamnéza krvácení, resp. posthemoragické anemie, přítomná DIC), po těžkém tupém poranění (anamnéza traumatu, výsledky fyzikálního vyšetření a zobrazovacích metod), při diseminované intravaskulární koagulaci (šok, infekce a další provokační momenty, laboratorní obraz konsumpční koagulopatie), během sepse (příčina trombocytopenie u 50 % pacientů, příčinou bývá snížená tvorba, zvýšená spotřeba při excesivní generaci trombinu a adhezi destiček na endotelu a/nebo sekvestrace, hemofagocytóza) nebo v systému mimotělního oběhu. Zvýšenou spotřebu destiček potvrdí skutečnost, že počet destiček nestoupne po transfuzi dvou ABO identických terapeutických jednotek destičkových transfuzních přípravků [2].

Zvýšenou sekvestrací destiček ve zvětšených játrech a/nebo slezině lze očekávat u pacientů s anamnézou chronického jaterního onemocnění s portální hypertenzí. Sonografický průkaz hepatosplenomegalie a patologických změn portálního řečiště může přispět k potvrzení tohoto podezření [2,6].

Poruchu tvorby destiček je u pacientů na JIP třeba zvažovat po intoxikacích vč. alkoholu, u pacientů s aktivním virovým onemocněním (HIV, HCV, EBV, CMV) a u nemocných s infiltrací kostní dřeně nádorovým procesem (leukoerythroblas-

tové reakce) nebo s útlumem krvetvorby po radioterapii nebo chemoterapii [2,6].

K vystupňované destrukci cirkulujících destiček dochází u pacientů na JIP při ITP, DITP, HIT, TMA, APS nebo CAPS apod. U pacientů s ITP bývá známá anamnéza, neexistuje specifický text, může pomoci průkaz specifických protilátek proti destičkovým glykoproteinům nebo odpověď na imunosupresivní léčbu. Průkaz DITP je zpravidla klinický, tzn. nový lék v posledních 7–14 dnech, zpravidla těžká trombocytopenie pod  $20 \times 10^9/l$  upravující se po vysazení léčiva. Hematologickou urgencí je HIT, kterou je potřeba zvažovat při poklesu počtu destiček o 50 % původního počtu (nadir  $20-80 \times 10^9/l$ ) typicky mezi 5. a 14. dnem terapie hepariny. Při pravděpodobné HIT je nutné přerušit léčbu hepariny a neodkladně vyšetření HIT protilátek. Další hematologickou urgencí jsou trombotické mikroangiopatie (TTP, HUS nebo jiné sekundární TMA). Při současném rozvoji trombocytopenie, neimunní, mikroangiopatické hemolytické anémie a orgánové symptomatologie je nutno odebrat vzorky krve k další diferenciální diagnostice TMA a nejpozději do 24 hodin zahájit léčbu výměnnými plazmaferézami. Prudký průběh s rychle se rozvíjejícím multiorgánovým selháváním a vysokou mortalitou má CAPS, který vyžaduje podobně jako TMA nebo HIT rozhodný diagnosticko-terapeutický přístup, tj. laboratorní průkaz antifosfolipidových protilátek, léčbu vyvolávajícího onemocnění, antitrombotickou terapii a farmakologickou kontrolu cytokinové bouře (hepariny, kortikosteroidy, výměnné plazmaferézy, intravenózní imunoglobuliny etc.). U pacientů na JIP, kteří vyvinuli trombocytopenii pod  $10 \times 10^9/l$  s krvácivými projevy po podaných transfuzích je třeba vyloučit potransfuzní purpuru [2,6].

### NOVĚ VZNIKLÁ TROMBOCYTOPENIE U TĚHOTNÉ ŽENY

Trombocytopenie nově vzniklá během gravidity je nepochybně pro hematologu výzvou. V klinické praxi se porodníci obra-

cejí na hematologu s žádostí o konsultaci a spolupráci i v případech trombocytopenie ryze porodnických – gestační trombocytopenie, trombocytopenie u těžké preklampsie, HELLP syndromu nebo u ještě vzácnější akutní steatózy jater v graviditě (AFLP). Role hematologa spočívá ve schopnosti poskytovat komplexnější diferenciální diagnostiku trombocytopenie v graviditě – tzn. ITP s nebo bez AIHA, APS, TTP nebo HUS apod.

Pokles počtu destiček pod  $150 \times 10^9/l$  provází asi 10 % všech gravidit. U žen s nově vzniklým poklesem počtu destiček během gravidity je třeba vyloučit život ohrožující onemocnění, bezpečně zajistit bezpečný počet destiček kolem porodu a zhodnotit riziko trombocytopenie matky pro plod.

Obecně je třeba pátrat po krvácivých projevech (petechie, purpura etc.), po současné hypertenzi (preeklampsie, HELLP syndrom), po známkách preexistujících systémových onemocnění, lymfadenopatii, hepatosplenomegalii (SLE, malignity), po současné hemolýze (Evansův syndrom, TTP), po bolestech břicha a dyspepsii (HELLP syndrom) nebo po neurologických projevech (TTP, těžká preeklampsie). V prvním trimestru

se specifické „těhotenské“ trombocytopenie nevyskytují, dominuje zde ITP. Ve druhém a třetím trimestru je možné se orientovat podle počtu destiček. Gestační trombocytopenie jsou zpravidla mírné (neklesají významně pod hodnotu  $100 \times 10^9/l$ ) a jsou relativně stabilní. Naopak u ITP může být trombocytopenie těžká. Prudký pokles destiček pod  $50 \times 10^9/l$  je důvodem pro vyloučení preeklampsie, HELLP syndromu, resp. TTP, a především postpartálně HUS [7].

## ZÁVĚR

Diferenciální diagnostika trombocytopenie znamená potvrdit, že skutečně jde o trombocytopenii a pokud ano, správně určit, jak urgentní má být diagnosticko-terapeutický postup. Pro nehematologu jsou významné změny krevního obrazu, zvláště těžká trombocytopenie obávaným problémem. Pro klinického hematologa to mj. znamená, že musí být připraven podobné situace řešit racionálně v kteroukoli denní dobu.

## Literatura

1. Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 2013;201(6):785–796. doi: 10.1083/jcb.201304054.

2. Greinacher A, Selleng S. How I evaluate and treat thrombocytopenia in the intensive care unit patient. *Blood* 2016;128(26):3032–3042. doi: 10.1182/blood-2016-09-693655.

3. Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol* 1995;50(2):103–109.

4. Arnold DM, Curtis BR, Bakchoul T, Platelet Immunology Scientific Subcommittee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Recommendations for standardization of laboratory testing for drug-induced immune thrombocytopenia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015;13(4):676–678. doi: 10.1111/jth.12852.

5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006;4(2):295–306. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x.

6. Thiele T, Selleng K, Selleng S, Greinacher A, Bakchoul T. Thrombocytopenia in the intensive care unit-diagnostic approach and management. *Semin Hematol* 2013;50(3):239–250. doi: 10.1053/j.seminhematol.2013.06.008.

7. Pishko AM, Levine LD, Cines DB. Thrombocytopenia in pregnancy: Diagnosis and approach to management. *Blood reviews* 2020;40:100638. doi: 10.1016/j.blre.2019.100638.

8. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv* 2019;3(22):3780–3817. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000812.

# Současná terapie ITP

Červinek L.

Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

Imunitní trombocytopenii (ITP) řadíme mezi autoimunitní onemocnění. Choroba je definována dočasným či trvalým snížením počtu krevních destiček a následným zvýšeným rizikem krvácení. Trombocytopenie je způsobena destrukcí destiček v orgánech monocyto-makrofágového systému. Dalším patogenetickým mechanismem u ITP je postižení uvolňování krevních destiček z megakaryocytů. Pacienti s krvácivými projevy či s nízkou hladinou trombocytů jsou indi-

kováni k zahájení léčby. Cílem léčby imunitní trombocytopenie je zabránění krvácení u pacienta dosažením dostatečné a stabilní hodnoty krevních destiček.

## LÉČBA IMUNITNÍ TROMBOCYTOPENIE

Novinkou je zahrnutí pacienta do rozhodování o ITP léčbě. Zahájení léčby pacientů s ITP je doporučováno při snížení počtu krevních destiček pod  $20-30 \times 10^9/l$ . Pokud jsou přítomny krvácivé

projevy, je indikováno zahájení léčby i při hodnotách vyšších. Léčbu je potřeba individualizovat, přihlídnout k přáním pacienta a jeho životnímu „rizikovému profilu“. Cílem léčby je prevence krvácení a dosažení bezpečné, i když ne nutně normální hodnoty krevních destiček.

## LÉČBA V 1. LINII

### Kortikosteroidy

Kortikosteroidy potlačují fagocytární aktivitu a snižují syntézu autoprotíla-

tek. Standardní iniciační kortikosteroidní léčbou je prednison (nebo jeho ekvivalent) v dávce 0,5–2 mg/kg/den po dobu 2–3 týdnů s postupným snižováním dávky či dexametazon 40 mg/den po dobu 4 dnů opakovaný až 3x. Je doporučeno zkrátit dobu podání kortikoidů na 6–8 týdnů.

### Intravenózní imunoglobuliny (IVIG)

Podání IVIG je vhodné při nutnosti emergentní terapie, dále pak u dětí a v těhotenství, zejména v první trimestru, kdy jsou kontraindikovány kortikosteroidy. Nejčastěji je doporučována dávka 1 g/kg ve dvou dnech, či 2 g/kg v jeden den nebo 0,4 g/kg po dobu 5 dnů.

## LÉČBA ITP V 2. LINII

V léčbě druhé linie ITP došlo v posledních letech k zásadnímu posunu od imunosupresivní léčby k podání nových léků. V této skupině můžeme léčebné možnosti rozdělit na léky s robustními daty z randomizovaných klinických studií a starší léky bez dat randomizovaných studií, v neposlední řadě zůstává mezi léčebnými metodami druhé linie i oddálená splenektomie.

### Agonisté TPO receptoru (TPO-RA)

Agonisté TPO receptoru mají pro léčbu ITP nejvyšší stupeň doporučení (stupeň doporučení A, úroveň důkazů Ib) ze všech používaných léčebných modalit. Schválenou indikací pro léčbu TPO-RA je podávání dospělým pacientům s chronickou formou ITP, kteří jsou refrakterní k jiným způsobům léčby (např. kortikosteroidy, imunoglobuliny). Do skupiny agonistů TPO receptoru řadíme tři preparáty, a to romiplostim a eltrombopag a nově i avatrombopag. Romiplostim představuje unikátní molekulu, takzvané peptibody, skládající se ze dvou částí. První část je vlastní účinná sekvence molekuly, připravená metodami molekulární genetiky, vážící se na oblast TPO receptoru megakaryocyty, ale v jiné vazebné oblasti než endogenní TPO. Druhá část romiplostimu zabezpečuje stabilitu preparátu v čase a umož-

ňuje podávání preparátu subkutánně jednou týdně. Léčba spočívá v subkutánní aplikaci romiplostimu v dávce 1–10 µg/kg/týden (dávka je odvislá od počtu destiček). V rámci klinických studií byla léčebná odpověď dosažena u 88 % nesplenektomovaných a u 79 % splenektomovaných pacientů.

Druhým agonistou TPO receptoru je eltrombopag. Ten působí též aktivačně na TPO receptor megakaryocyty a to vazbou na jiné vazebné místo, než kam se váže endogenní TPO. Tento preparát neobsahuje stabilizační vazbu, proto je nutné každodenní perorální podávání léku. Strukturálně jde o malou molekulu podávanou orálně v dávce 25–75 mg/den.

Léčebná odpověď byla dosažena u více než 80 % pacientů, kteří užívali eltrombopag v rámci klinických studií. Třetím TPO agonistou je perorální přípravek avatrombopag. Preparát byl úspěšně testován v rámci klinických studií u pacientů s chronickou ITP. Obecně schválenou indikací pro léčbu TPO agonisty představují pacienti s chronickou formou ITP, kteří jsou refrakterní k jiným způsobům léčby (jako například kortikoidy, imunoglobuliny). Další práce rovněž ukázaly, že u některých pacientů je možné dávku TPO agonistů postupně snížit, a dokonce i vysadit, aniž by došlo k návratu nemoci. Jedná se o takzvanou setrvalou remisi, jejíž incidence se odhaduje asi u 20 % nemocných.

### Inhibitor splenické (SYK) kinázy v léčbě ITP

Další novinkou v oblasti ITP je fostamatinib, perorální inhibitor splenické SYK tyrozinkinázy. Na protilátkách závislá fagocytóza je primárním mechanismem, jímž dochází u ITP pacientů k destrukci trombocytů. Slezina je dominantní místo produkce protilátek i hlavní místo destrukce opsonizovaných trombocytů. Někteří pacienti mohou mít i minoritní místo destrukce trombocytů v játrech. Lidské makrofágy exprimují různé Fc receptory, jež se specificky vážou na IgG imunoglobuliny. Funkčně rozpoznáváme inhibiční

a aktivační Fc receptory, jež přenášejí signál cestou tyrozinkinázového receptoru. Jako hlavní receptory jsou označovány FcR gamma IIa a FcR gamma IIIa, jež jsou zodpovědné za vychytávání opsonizovaných trombocytů. Aktivace FcR gamma IIa receptoru na povrchu makrofágu cestou trombocytu s navázanou protilátkou spouští intracelulární signalizační dráhu zabezpečenou SYK tyrozinkinázovým receptorem. Fostamatinib, orální inhibitor slezinné tyrozinkinázy (SYK), dosáhl primárního léčebného cíle v randomizované dvojité zaslepené klinické studii fáze 3. O podání fostamatinibu lze uvažovat u pacientů s prokázanou rezistencí na agonisty TPO receptoru.

### V neposlední řadě se do skupiny preparátů s daty z klinických studií řadí i rituximab

Rituximab, monoklonální chimérická protilátka proti receptoru CD20, se váže na B-lymfocyty a způsobuje jejich lýzu mediovanou FcR cestou aktivace komplementu či cestou buněčné imunity. Rituximab působí snížení počtu B-lymfocytů, a tím následné snížení počtu produkovaných autoprotilátek, a dále i blokádu retikuloendoteliálního systému. Po léčbě rituximabem lze v nerandomizovaných studiích pozorovat 40–60 % kompletních léčebných odpovědí. Dlouhodobě zůstává v remisi asi 15–20 % nemocných. Léčba rituximabem je většinou dobře snášena, ale je nutno upozornit na možné závažné nežádoucí reakce při podávání této protilátky, k nimž náleží zvýšená teplota, poruchy srdečního rytmu a vzácně i výskyt anafylaxe. Rituximab zvyšuje riziko aktivity latentních infekcí, jako jsou hepatitida typu B či JC viróza a PML (progressivní multifokální leukoencefalopatie).

### V rámci druhé linie pro pacienty s ITP zůstávají starší imunosupresivní léky

Azathioprin je prekurzor 6-merkaptopurinu, antimetabolitu, jenž blokuje lymfocytární proliferaci. Obvyklé dávkování je 1–2 mg/kg/den.

Cyklosporin A je kalcineurinový inhibitor potlačující proliferaci T-lymfocytů. Obvyklé dávkování je 2,5–3 mg/kg/den. Je podáván obvykle v kombinaci s kortikosteroidy. Cyklofosfamid je alkylující látka užívaná jako imunosupresivum či cytostatikum. Dávkování používané u pacientů s ITP je 1–2 mg/kg/den perorálně či v pulzech parenterálně. Vzhledem k mutagennímu potenciálu je lék u mladších pacientů nevhodný.

Danazol je slabý androgen. Jeho mechanismus účinku spočívá pravděpodobně v ovlivnění Fc-receptoru. Doporučené dávkování je 400–800 mg denně, ale dobré výsledky byly zaznamenány i při dávkování 100–200 mg danazolu denně. Celkově přibližně 60–70 % pacientů odpoví na léčbu příznivě. Léčba danazolem je obvykle dobře snášena, z nežádoucích účinků jsou časté elevace jaterních testů, virilizující účinek, přírůstek hmotnosti a retence tekutin. Lék je vhodný především pro starší pacienty, kteří v úvodu reagovali na kortikosteroidní léčbu a u nichž danazol umožní snížit celkovou dávku kortikosteroidů. Další vhodnou indikací jsou překryvné syndromy s autoimunitami typu systémový lupus erythematoses, nebo jako léčebná eventualita při kontraindikaci splenektomie.

Dapson (diaminodifenyl sulfon) je primárně určen do kombinační terapie pro pacienty s leprou. Pro svůj imunomodulační účinek byl testován u pacientů s chronickou ITP v dávce 75–100 mg/den.

Lék je vhodný především do kombinace s kortikosteroidy a umožní snížit celkovou dávku kortikosteroidů, bohužel léčebný účinek přetrvává pouze při trvalém podávání.

Mykofenolát mofetil je prekurzorem kyseliny mykofenolové, jež je nekompetitivním inhibitorem inosin-50-monofosfátdehydrogenázy, klíčového enzymu v biosyntéze purinů. Dávkování je obvykle 1–2 g/den, léčebného účinku je dosahováno přibližně po 3–4 týdnech podávání.

### CHIRURGICKÁ LÉČBA ITP

Splenektomie, stupeň doporučení C, úroveň důkazů IV. Slezina představuje důležité místo produkce protilátek a je také hlavním místem destrukce destiček s navázanými autoprotilátkami. V současnosti představuje splenektomie 2. linii léčby pacientů s ITP, je tedy doporučována po selhání 1. linie. Provedení splenektomie vykazuje vysoký podíl léčebných odpovědí: 66 % nemocných je bez potřeby další terapie. Přibližně 20 % respondérů dospěje postupem času k relapsu onemocnění. Všeobecně je doporučováno vyčkat s provedením splenektomie s přihlédnutím ke stavu pacienta, optimálně 12 měsíců, vzhledem k možnosti dosažení remise onemocnění (v některých případech i do jednoho roku od diagnózy). Splenektomii je možno provést klasickou či laparoskopickou technikou. Mortalita výkonu je nízká, do 1 %, častější jsou pooperační

komplikace, například infekce v ráně či hematoma. Pacienti jsou po provedené splenektomii ohroženi infekcí opouzdřenými mikroby, tzv. overwhelming post-splenectomy infection (OPSI), s incidencí 3,8–4,3 % a mortalitou 1,7–2,5 %. Proto by všichni pacienti, u kterých je plánována splenektomie, měli před výkonem podstoupit aktivní imunizaci (očkování) dostupnými vakcínami proti pneumokokům, meningokokům a hemofilům. Revakcinace by měla probíhat podle doporučení výrobce konkrétní vakcíny. Pokud je v době indikace splenektomie pacient léčen imunosupresivní terapií, lze jej očkovat až po provedení splenektomie po předchozím snížení dávkování imunosupresivní terapie. V souvislosti s podáváním antibiotik jako profylaxe infekce po splenektomii nepanuje všeobecný konsensus. Některá pracoviště aplikují antibiotickou profylaxi 6 měsíců, jiná 3 roky, další doživotně.

### NOVÉ LÉČEBNÉ POSUNY V TERAPII ITP

V oblasti klinického výzkumu jsou nyní v České republice dostupné inhibitory neonatálního Fc receptoru makrofágu. Jedná se o dva preparáty, anti FcRn inhibitory Rozanolixizumab a Efgartigimod. Další nadějnou molekulou v klinickém výzkumu je orální inhibitor Brutonovy tyrozinkinázy. Dosavadní výsledky provedených klinických studií s těmito preparáty vypadají nadějně, ale výzkum nebyl dosud ukončen.

## Diferenciální diagnostika neutropenie

**Doubek M.**

*Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno  
Ústav lékařské genetiky a genomiky LF MU a FN Brno*

Neutropenie (periferní neutropenie) je definovaná jako snížení absolutního počtu neutrofilů (ANC) v periferní krvi pod  $2,0 \times 10^9/l$  [1]. Neutropenie se podle hod-

noty ANC dělí na těžkou (ANC  $< 0,5 \times 10^9/l$ ), středně těžkou (ANC  $0,5 - 1 \times 10^9/l$ ) a mírnou (ANC mezi  $1$  a  $2,0 \times 10^9/l$ ). Může se manifestovat jako permanentní (stálá) nebo

přechodná (tranzientní) a podle původu je buď získaná, nebo dědičná.

Diagnózu chronické neutropenie je třeba potvrdit alespoň ze 3 nezávis-

lých odběrů periferní krve v průběhu 3 měsíců. Pokud neutropenie přetrvává, je třeba až na výjimky (benigní etnicky podmíněná neutropenie) zvažovat další vyšetření, případně genetickou konzultaci.

Periferní neutropenie se vyskytuje až u 1 % populace, s častějším výskytem v určitých regionech (Afrika, Střední Východ). Většinou jde o získané neutropenie. Dědičné neutropenie jsou velmi vzácné, pozorované u méně než 1/100 000 osob [2]; to znamená, že méně než 1/1 000 případů neutropenie je dědičný. Nicméně z pohledu diferenciální diagnostiky je třeba na dědičné neutropenie myslet, neboť průkaz dědičného původu má často zásadní vliv pro prognózu nemocného a ovlivňuje riziko vzniku nádorových onemocnění.

## TRANZIENTNÍ NEUTROPENIE

Přechodná neutropenie je nejčastěji asociovaná s virovými infekcemi. Dále jsou příčinami přechodné neutropenie i některé bakteriální infekce nebo léčba (chemoterapie) [3]. Příčiny tranzientní neutropenie shrnuje tab. 1.

## CHRONICKÉ NEUTROPENIE

Jak už bylo uvedeno, chronické neutropenie trvají déle než 3 měsíce [3]. Příčiny chronických neutropenií shrnuje tab. 2.

## DĚDIČNÉ NEUTROPENIE

Diagnóza dědičné neutropenie (DN) bez ohledu na detekovanou kauzální genetickou mutaci představuje pro pacienty vyšší **riziko vzniku hematologické malignity** (10–60 %) ve srovnání s ostatní populací (0,01 %) [4].

Distribuce výskytu DN v populaci je částečně podmíněna etnickým původem: mutace genu *HAX1* v Kurdistánu (Malé Asii) nebo Švédsku, *G6PC3* genu v Arménii a *AP14* genu u Menonitů. Mutace v genech *ELANE*, *SBDS*, *SLC37A4* a *CXCR4* se vyskytují nezávisle na etnickém původu.

DN jsou monogenně podmíněným onemocněním. Dosud bylo identifikováno

**Tab. 1. Příčiny přechodné neutropenie.**

Infekce	
Viry	cytomegalovirus, virus Epsteina-Barrové, HIV, influenza, parvovirus B19
Bakterie	brucelóza, tuberkulóza, tularemie, tyfus, rickettsie
Protozoa	<i>Plasmodium vivax</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>
Léky	
Antikonvulziva	kabramazepim, valproát
Antibakteriální léky	sulfonamidy, peniciliny, cotrimoxazol
Antipsychotika	klozapin, olanzapin, fenotiazidy
Antirevmatika	levamizol, zlato, penicilamin
Chemoterapeutika	
Tyreostatika	propylthiouracil
Jiné	aminopyrin, deferipron, rituximab, venetoklax
Imunitní příčiny	
Neonatální	
Autoimunitní	

**Tab. 2. Příčiny chronické neutropenie.**

Způsobená zevními vlivy	
Nutriční	deficit vitamínu B <sub>12</sub> , deficit folátu, měď, malnutrice
Imunitní	autoimunitní, systémové onemocnění pojiva
Porucha krvetvorby	
Myelodysplázie	
Aplastická anémie	
Dědičné neutropenie a syndromy selhání kostní dřeně	
Idiopatické	

váno více jak 24 genů asociovaných se vznikem dědičné neutropenie [5]. Většinou jde o mutace v genech zodpovědných za nitrobuňčnou regulaci translace prostřednictvím stresu endoplazmatického retikula, a překvapivě ne o geny angažující se v granulopoéze. Nejefektivnějším způsobem zjištění genetické mutace je použití masivního paralelního sekvenování, zejména sekvenování celých exomů, protože škála genů a jejich variant zodpovědných za vznik DN je široká. Jde o různé typy genetických mutací, často o nové „missense“ záměny, jejichž interpretace

bývá obtížnější vzhledem k absenci funkčních testů. Často bývá taková varianta klasifikována dle mezinárodních doporučení [5] jako varianta nejasného významu (VUS). K objasnění patogenity detekované varianty je vhodné provést genetickou konzultaci zejména s ohledem na rodinnou anamnézu nádorových onemocnění (leukémií, ale i solidních tumorů), výskytu infekčních onemocnění od dětství včetně gingivitidy a stomatitidy. Důležité je také zjistit, zda detekovaná varianta segreguje s fenotypem neutropenie. Optimálním postupem pro zařazení nové, dosud nepopsané varianty

Tab. 3. Základní charakteristiky dědičných neutropenií v dospělosti.

Onemocnění	Dědičnost	Gen	Klinické projevy	Riziko vzniku nádorového onemocnění
Benigní etnická neutropenie (BEN)	–	<i>DARC/ACKR1</i>	neutropenie	populační riziko
Benigní familiární neutropenie	–	neznámý	neutropenie	populační riziko
Cyklická neutropenie	AD	<i>ELANE</i>	intermitentní neutropenie, během ní středně závažné až závažné infekce	*15 % AML/ALL
Vrozená neutropenie s mutací <i>HAX1</i>	AR	<i>HAX1</i>	neutropenie	*30 % AML/ALL/CMML/MDS
Shwachman-Diamond syndrom (SDS)	AR	<i>SBDS</i>	neutropenie, porucha exokrinní funkce pankreatu, malý vzrůst, dysplázie metafáz, mentální postižení	30 % MDS/AML
Fanconioho anémie (FA)	AR, X	Skupina <i>FANC</i> genů	neutropenie, trombocytopenie, pigmentační změny kůže, vícečetné anomálie skeletu, srdce, ledvin, gonád, nízká postava, nízká porodní hmotnost (< 2 500 g), hluchota	30–60 % MDS/AML solidní nádory
GATA2 syndrom	AD	<i>GATA2</i>	Heterogenita klinického obrazu: 1) MonoMAC: monocytopenie a mykobakteriální infekce 2) DCML nedostatečnost: poruchy dendritických buněk, monocytů, B lymfocytů a NK buněk 3) Embergerův syndrom: lymfedém, hluchota a MDS 4) dědičný myelodysplastický syndrom / AML 5) WILD syndrom: bradavice, imunodeficience, lymfedém a anogenitální dysplázie 6) chronická neutropenie	75 % MDS/AML/MPN/CMML

\*riziko je uvedeno pro těžkou vrozenou neutropenii, kde je třeba podávat vysoké dávky G-CSF, pro mírnou intermitentní formu bez terapie G-CSF riziko stanovené není

AD – autozomálně dominantní, AR – autozomálně recesivní, X – dědičnost variant genů na chromozomu X, MDS – myelodysplastický syndrom, AML – akutní myeloidní leukémie, MPN – myeloproliferativní neoplázie, CMML – chronická myelomonocytární leukémie

je následně provedení funkční analýzy k průkazu její patogenity [6].

U některých pacientů může dojít k pozdějšímu stanovení diagnózy DN z důvodu mírných nebo chybějících hematologických abnormalit nebo abnormalit při fyzikálním vyšetření až na základě dalších komplikací, např. nádorového onemocnění nebo při genotypování celé rodiny.

Základní charakteristiky nesyndromových i syndromových neutropenií v dospělosti jsou uvedeny v tab. 3.

## VYŠETŘENÍ U PACIENTA S NEUTROPENIÍ

U pacientů s neutropenií je třeba provést tato základní vyšetření:

1) Podrobná anamnéza se zaměřením na rodinnou anamnézu, další onemocnění v osobní anamnéze a souběžnou léčbu.

2) Podrobné fyzikální vyšetření včetně posouzení event. kongenitálních abnormalit a infekcí (kožní infekce, gingivitidy).

3) Podrobné laboratorní vyšetření: krevní obraz s mikroskopicky odečteným diferenciálním rozpočtem leukocytů (pro stanovení diagnózy cyklické neutropenie je třeba až 20 vyšetření krevního obrazu během 40 dní); protilátky proti granulocytům; průtoková cytometrie (např. k určení počtu velkých granulárních lymfocytů); antinukleární protilátky; hladina  $B_{12}$  a folátu; vyšetření serologická a molekulární v případě podezření na infekční etiologii; vyšetření kostní dřeně (především u chronických neutropenií) – histologie, cytologie, cytogenetika; molekulární genetika (vyšetření germinálního

genomu po konzultaci s klinickým genetikem) [7].

## ZÁVĚR

Diferenciální diagnostika neutropenií je i v současnosti pro lékaře mnohdy stále výzvou. Díky novým metodám (především v molekulární diagnostice) je ale možné řadu dříve nejasných případů neutropenie klasifikovat.

## Poděkování

Podpořeno grantovým projektem MZ ČR (grant AZV NU20-08-00137) a COST Action CA18233. Poděkování patří i Mgr. Kateřině Staňo Kozubík, Ph.D. z pomoci s přípravou tohoto souhrnu.

## Literatura

1. Americans. Hydrocortisone-induced granulocytosis in the 'benign' neutropenia of the black. *Am J Med.* 1979;67:201–205.
2. Donadieu J, Beaupain B, Mahlaoui N, Bellanné-Chantelot C. Epidemiology of congeni-



tal neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27:1–17.

3. Newburger DE, Dale DC. Evaluation and Management of Patients with Isolated Neutropenia. *Semin Hematol.* 2013;50(3):198–206.

4. Donadieu J, Beaupain B, Fenneteau O, Bellanné-Chantelot C. Congenital neutropenia in the era of genomics: classification, dia-

gnosis, and natural history. *Br J Haematol.* 2017;179:557–574.

5. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–424.

6. Brnich SE, Abou Tayoun AN, Couch FJ, et al. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework. *Genome Med.* 2019;12.

7. Dale DC. How I diagnose and treat neutropenia. *Curr Opin Hematol.* 2016; 23(1):1–4.

## Vzácnější onemocnění způsobující cytopenie u dospělých: Hemofagocytární lymfocytóza, Gaucherova choroba

Kozák T.

FNKV Praha

Gaucherova choroba patří do skupiny vzácných dědičně podmíněných lysosomálních onemocnění (*lysosomal storage diseases* – LSD), které jsou způsobeny sníženou aktivitou některého z lysosomálních enzymů. Gaucherova choroba je způsobena sníženou aktivitou glukocerebrosidázy 1 (GBA1) v důsledku mutace genu pro GBA1, jenž je umístěn na chromozomu 1q21. Jde o autozomálně recesivně dědičné onemocnění, u něhož je známo více než 400 mutací genu pro GBA1, některé jsou více, jiné méně frekventní, ve většině případů jde o mutace bodové. Incidence Gaucherovy choroby je 0,4–5,8/100 000 živých porodů, onemocnění je frekventnější (GD typ 1) v populaci Aškenazi Židů.

Patofyziologickým podkladem Gaucherovy choroby je hromadění nerozložených glykolipidů v lysozomech makrofágů, které získávají charakteristický vzhled „zmačkaného papíru“ a hromadí se ve viscerálních orgánech, zejména ve slezině a játrech, ale také v kostní dřeni a kostech. U tzv. neuropatických forem (GD typ 2, GD typ 3) lze Gaucherovy buňky najít také v centrálním nervovém systému. Přítomnost Gaucherových buněk v orgánech vede k organomegalii a následně k orgánové dysfunkci. Počet Gaucherových buněk v postižených orgánech ale takovým změnám neodpovídá, nejde tedy o pro-

stou mechanickou masivní infiltraci, ale o zánětu podobnou humorální reakci zprostředkovanou zvýšenou sekrecí catherpsinu a interleukinů, zejména IL-6 a IL-8 a IL-10.

Gaucherova choroba (*Gaucher disease* – GD) je svým fenotypem spektrem onemocnění s různou mírou orgánového postižení, od hydropsu s úmrtím *in utero* přes těžké formy neslučitelné se životem po narození až po nenápadné subklinické formy, které mohou být diagnostikovány v pozdním dospělém věku. Klasicky se ale rozlišují tři formy: GD typ 1, GD typ 2, GD typ 3. Nejčastější forma Gaucherovy choroby je GD typ 1 (90 % Gaucherovy choroby). Odlišuje se od ostatních dvou mimo jiné nepřítomností postižení CNS. Je to forma, která je častá v populaci Aškenazi Židů s prevalencí 1/850, ale není zdaleka omezena jen na tuto populaci. Může být diagnostikována v každém věku, v dětství se může projevat poruchou růstu a zpožděným nástupem puberty. Tato forma GD však patří právě mezi ta onemocnění, která musíme brát v úvahu při diferenciální diagnostice organomegalie a cytopenie v dospělém věku. Devadesát procent pacientů s Gaucherovou chorobou navštíví před tím, než je onemocnění diagnostikováno, ambulanci hematologa. Nejčastějšími příznaky v dospělém věku jsou: splenome-

galie, hepatomegalie (není tak výrazná jako splenomegalie) a cytopenie. **Z cytopenií je nejčastějším nálezem trombocytopenie různého stupně, je dána hypersplenismem a zároveň nedostatečnou megakaryopoézou v kostní dřeni. Častým symptomem tohoto typu GD je hemoragická diatéza, která je zapříčiněna jak trombocytopenií, tak často přítomnou koagulopatií a trombocytopenií. Teprve v dalším průběhu onemocnění se vyvíjí anémie, u nejvíce pokročilých forem může být i neutropenie. Časným příznakem Gaucherovy choroby, ve chvíli, kdy je již přítomna trombocytopenie, může být i lymfopenie. Pacienti s GD typ 1 mají také vyšší incidence maligních onemocnění včetně leukémií, lymfomů a mnohočetného myelomu.**

Do fenotypu GD typ 1 patří také postižení kostí, kostní deformity zejména v oblasti distálního femuru (ale mohou být kdekoli), stejně jako těžká osteoporóza s patologickými frakturami. Pacienti s GD mohou procházet tzv. kostními krizemi, kdy v krátkém období dochází k mnohočetným patologickým frakturám. Přímé postižení CNS u GD typ 1 není, nicméně existují údaje o zvýšeném riziku časného nástupu Parkinsonovy choroby u těchto pacientů, mechanismus není plně objasněn. Vzácně

**Tab. 1. Diagnostická kritéria (HLH 2004).**

Diagnózu HLH podporuje splnění  $\geq 5$  z 8 kritérií:

Horečka

Splenomegalie

Cytopenie  $\geq 2$  linií (HGB  $< 90$  g/l, PLT  $< 100 \times 10^9$ /l, ANC  $< 1,0 \times 10^9$ /l)

Hypertriglyceridemie (nalačno)  $\geq 3,0$  mmol/l a/nebo hypofibrinogenemie  $\leq 1,5$  g/l

Hemofagocytóza v kostní dřeni (slezině nebo lymfatické uzlině)

Ferritin  $\geq 500$   $\mu$ g/l

Nízká aktivita NK buněk

Solubilní receptor pro IL-2 (sCD25)  $\geq 2 400$  U/ml

je součástí fenotypu GD typ 1 postižení plic. Laboratorně může kromě cytopenie upozornit na Gaucherovu chorobu hyperferitinemie, monoklonální nebo polyklonální gamapatie.

Podezření na Gaucherovu choroby GD typ 1 v dospělém věku bychom tedy měli mít v případě suspektního klinického průběhu s průkazem organomegalie, zejména splenomegalie (87 % pacientů s GD), event. kostního postižení, a typické laboratorní triády: trombocytopenie ( $\pm$  neutropenie a lymfopenie), kterou má 82 % pacientů s GD, hyperferitinemie (87 % pacientů s GD) a gamapatie (monoklonální nebo polyklonální). V kostní dřeni nebo v jiné tkáni odebrané v rámci diagnostiky nejasného stavu (např. jaterní biopsie) jsou přítomné typické Gaucherovy buňky.

Diagnózu definitivně potvrdí průkaz snížené aktivity GBA1 v leukocytech periferní krve a molekulárně genetický průkaz mutace genu pro GBA1.

Vzácné, tzv. neuronopatické formy Gaucherovy choroby GD typ 2 a GD typ 3 jsou kromě výše uvedených projevů typické progredujícím postižením CNS, které má u GD typ 2 akutní průběh a u GD typ 3 pomalejší, nicméně obě tyto formy jsou obvykle zachyceny v dětství.

Léčba GD typ 1 a některých forem GD typ 3 je založena na substituci chybějícího enzymu (ERT – *enzyme replacement therapy*), u dospělých pacientů s GD je také snaha o tzv. redukci produkce substrátu (substrate reduction

therapy – SRT), tedy omezení produkce cerebrosidu.

Hemofagocytární lymfohistiocytóza (HLH) je vzácné onemocnění, které ve své familiární formě postihuje zejména děti, ale je nutné na ně myslet také u dospělých všech věkových kategorií. HLH u nich bývá poddiagnostikována, přitom řada získaných cytopenií může jít právě na vrub této choroby. U mladších dospělých může stále jít o familiární primární formu, u starších však jde častěji o formu sekundární, která bývá spojena s řadou patologických stavů. Diagnostická kritéria a léčebné postupy jsou dobře stanoveny u dětí, u dospělých není konsensus jednoznačný. Svou patogenezi je primární i sekundární HLH vystupňovaným zánětlivým syndromem s hyperferitinemií, udržovaným T lymfocyty a spojeným s potenciálně letální cytokinovou bouří. U familiární formy jde o geneticky podmíněný defekt cytolytické funkce T lymfocytů nebo NK buněk a/nebo o poruchu regulace tzv. inflamazomu. Spouštěčem sekundární HLH mohou být především infekce, hlavně virové (EBV, HIV, CMV, virus krymsko-konžské hemorhagické horečky atd.), ale také bakteriální, parazitární (toxoplazmóza, leishmanióza) nebo mykotické (*Aspergillus* spp.). Stále více HLH u dospělých (40–70 %) je diagnostikováno v souvislosti s malignitou, zejména hematologickou (lymfom, leukémie). HLH se vyskytuje u 2,8 % pacientů s lymfomem (nejvíce lymfomy z T a NK buněk). Hemofagocytární lymfohistiocytóza může být

vyvolána buďto působením neoplazie jako takové nebo může být komplikací protinádorové léčby. Po indukční léčbě akutní myeloidní leukémie (AML) se vyskytuje HLH až u 9 % pacientů. Další důležitou skupinou chorob, u níž je nutno s výskytem HLH počítat, jsou autoimunitní onemocnění jako systémový lupus erythematodes, revmatoidní artritida, Stillova choroba atd. U těchto onemocnění může mít HLH formu tzv. MAS (macrophage activation syndrome). Další situace, u nichž se sekundární HLH může vyskytnout, jsou například orgánové transplantace a transplantace krvetvorných buněk, dlouhodobá chronická imunosuprese, vakcinace, náročné chirurgické zákroky, hemodialýza a vzácně těhotenství. Cytokinová bouře, která může provázet buněčnou léčbu CART (Chimeric antigen receptor T cells) některých hematologických malignit, má také charakter HLH.

Klinicky se HLH u dospělých projevuje klasickou triádou: febrilie, **bi-tricytopenie** (často s krvácivou diatézou) a splenomegalii. Za cytopenii se u HLH obvykle považuje hemoglobin  $< 90$  g/l, trombocyty  $< 100 \times 10^9$ /l a ANC  $< 1,0 \times 10^9$ /l. Kromě této základní triády mohou manifestaci HLH provázet edémy, dušnost, průjem, ikterus, exantém, poruchy vědomí a projevy demyelinizace. Laboratorně pro HLH svědčí kromě cytopenie výrazně zvýšená hladina sérového ferritinu (u dospělých je často  $> 7 000$   $\mu$ g/l), hypertriglyceridemie, hyperbilirubinemie s elevací AST, zvýšená LDH, zvýšené D-dimery a snížená hladina fibrinogenu při normálním protrombinovém času. V aspirátu kostní dřene je u 85 % HLH zachycena typická hemofagocytóza. Diagnózu HLH může podpořit nález zvýšeného množství solubilního receptoru pro IL-2 (sCD25).

Dle mezinárodních doporučení je diagnózu HLH třeba postavit společně na základě anamnézy a diagnostických kritérií (HLH 2004 – viz tab. 1).

Léčba HLH u dospělých se řídí podle vyvolávající příčiny, přesto se v řadě případů opírá o zkušenosti s léčbou HLH

u dětí a je zaměřena na tlumení aktivity T buněk kombinací glukokortikoidů, etoposidu a cyklosporinu A. U některých indolentních forem může být léčbou kombinace kortikosteroidů s IVIG. U HLH vyvolaných infekcí je samozřejmostí léčba příslušné infekce. Průběh HLH ve spojitosti s aktivní EBV infekcí může být rychlý a vyžaduje si rychlé nasazení anti-T terapie v kombinaci s rituximabem. V případě HLH asociované s lymfomem (obvykle T- nebo NK lymfom nebo agresivní B lymfom) je do léčby příslušného lymfomu vhodné zařadit etoposid, pokud v plánované terapii ještě není. Výskyt HLH v průběhu chemoterapie nebo po ní je podhodnocen, je nutné ji mít na mysli zejména v případech nečekaných protrahovaných cytopenií po konvenční chemo (imuno) terapii. Výzvou je v tomto směru protrahovaná cytopenie po indukční léčbě AML, o níž nelze vždy říci, že je nečekaná. Až 9 % pacientů po

indukční léčbě AML může mít syndrom HLH. V těchto případech je samozřejmě obtížné indikovat etoposid, proto se u HLH asociované s AML podávají kortikosteroidy s IVIG. Léčba MAS spojeného s autoimunitními chorobami je specifickým problémem, opírá se o vysoké dávky methylprednisolonu, u rezistentních případů je indikován cyklosporin A, event. blokátor receptoru pro interleukinu 1 (anakinra), případně inhibice interleukinu 6 monoklonální protilátkou tocilizumab. Tocilizumab je účinný také při léčbě cytokinové bouře spojené s imunoterapií bispecifickou protilátkou blinatumomab nebo s podáním CART.

### Literatura

1. Motta I, Filocamo M, Poggiali E, et al. A multicentre observational study for early diagnosis of Gaucher disease in patients with splenomegaly and/or thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2016;96:352–359.
2. Mistry PK, Sadan S, Yang R, Yee J, and Yang M. Consequences of diagnostic delays in type 1

Gaucher disease: The need for greater awareness among Hematologists–Oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *Am J Hematol* 2007;82:697–701.

3. Hughes D, Capellini MD, Berger M, et al. Recommendations for the management of the haematological and oncohaematological aspects of Gaucher disease. *Br J Haematol* 2007;138:676–686.
4. Malinová V, Honzík T. Lysosomální onemocnění – současné možnosti diagnostiky a terapie. *Pediatr. Praxi* 2013; 14(2): 99–103
5. Detonellaere C, Benghergbia M, Brassier A, et al. Type 3 Gaucher inase, diagnostic in adulthood. *Mol Genet Metab Rep* 2017;13:1–2.
6. La Roseé P, Horne AC, Hines M, et al. Recommendations for the management of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Blood* 2019;133: 2465–2477.
7. Birndt S, Schenk T, Heinevetter B, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: collaborative analysis of 137 cases of a nationwide German registry. *Cancer Res Clin Oncol* 2020;146:1065–1077.
8. Knaak C, Nyvlt P, Schuster FS, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in critically ill patients: diagnostic reliability of HLH-2004 criteria and HScore. *Crit Care* 2020;24:244.

# Reálná epidemiologie onemocnění COVID-19 infekcí u nemocných s hematologickými malignitami v ČR

Ráčil Z.<sup>1</sup>, Žák P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

<sup>2</sup> IV. Interní hematologická klinika FN Hradec Králové

Epidemie onemocnění COVID-19 v Evropě a České republice postihla celou populaci, vč. nemocných s hematologickými malignitami, u kterých bylo možno očekávat závažnější průběh a vyšší mortalitu. Pro zjištění reálného spektra nemocných s hematologickou malignitou, u kterých došlo k rozvoji onemocnění COVID-19, identifikaci rizikových faktorů a klinického průběhu, včetně mortality, Evropská hematologická společnost vytvořila projekt EPICOID-EHA.

Tohoto projektu se zúčastnila také centra intenzivní hematologické péče z České republiky.

Projekt zahrnul více než 3 800 nemocných (v absolutní většině z Evropy) s hematologickou malignitou aktivní v posledních 5 letech a současným onemocněním COVID-19, které proběhlo v roce 2020.

Jde o největší a skutečně reálná data, která nejsou zatížena subjektivní lokální zkušeností jednoho či několika málo center, odkud často mohou vést k málo přesným či nepravdivým závěrům.

Data ukázala, že absolutně nejvíce postiženou skupinou byli nemocní s Non-Hodgkinskými lymfomy, téměř o polovinu méně často pak nemocní s mnohočetnými myelomy a 3× méně často nemocní s chronickou lymfatickou leukémií a akutní myeloidní leukémií. Všechny ostatní diagnózy tvořili přibližně pouze 5 % všech případů onemocnění COVID-19. Více jak 2/3 nemocných byly léčeny protinádorovými léky v posledních 3 měsících.

Podobně jako v běžné populaci byla absolutní většina nemocných s laboratorně prokázaným onemocněním starších 50 let. Na rozdíl od celé populace však 60 % případů infekcí COVID-19 bylo ošetřujícím lékaři identifikováno jako onemocnění se závažným průběhem (u běžné populace je udáván počet závažných a kritických případů souhrnně kolem 20 %) a 24 % vyžadovalo hospitalizaci na jednotce intenzivní péče.

Celková mortalita v souboru byla přes 30 %, a i přes to, že mortalita způ-

sobená COVID-19 onemocněním byla nižší, přibližně 20 %, stále mnohonásobně převyšuje mortalitu v celé všeobecné populaci. Jednoznačně nejvyšší byla mortalita u pacientů s akutní myeloidní leukémií a myelodysplastickým syndromem.

Při analýze se ukázalo, že hlavní příčinou takto závažného průběhu onemocnění COVID-19 je aktivita základního onemocnění, pouze 1/3 infikovaných nemocných byli totiž pacienti, kteří byli v kompletní remisi základního onemocnění. Není proto překvapením, že nejvyšší mortalita na onemocnění COVID-19 byla u nemocných, kteří byli léčeni demethylačními látkami, u pacientů, kteří byli léčeni paliativně anebo podstoupili podání CAR-T buněk.

Prezentace pak tato celoevropská data dá do kontextu s daty od více jak 350 nemocných s hematologickou malignitou a současným onemocněním COVID-19 zadanými do projektu za centra z České republiky.

## COVID-19 z pohledu intenzivisty

Šrámek V.

Anesteziologicko-resuscitační klinika, FN u svaté Anny v Brně, Lékařská fakulta MU

### ÚVOD

Intenzivní péče je obor vzniklý v 70. letech minulého století a je založený na komplexní péči o řadu orgánů a orgánových systémů. Velice často se postupuje syn-

dromologicky, a proto byla s postupem času vypracována řada univerzálních postupů/algorithmů. Cílem mého sdělení je upozornit, v čem se péče o COVID-19 nemocné lišila od zavedených postupů.

### SYSTÉMY

#### Respirační

Virus SARS-CoV-2 nejzávažněji postihuje buňky respiračního systému. Nejtěžší formy vedou k těžkému a dlouhotrvajícímu

cími hypoxickému (a hyperkapnickému) respiračnímu selhání. Podpůrná strategie selhávající výměny plynů:

- Použití systémů vysokoprůtokového O<sub>2</sub> (HFO), aplikovaných i na standardních lůžkách a neinvazivní ventilace (NIV). Právě NIV je ale spojována s některými vedlejšími účinky UPV – vysokým počtem barotraumat.
- Instrumentace u aerosol generujících procedur (OTI, BSK atd.) vedla k vypracování alternativních postupů – např. většinové použití videolaryngoskopu u OTI, absence ambuingu atd.
- UPV pozitivní přetlak. Těžké respirační selhání představuje výzvu najít kompromis mezi zachováním nutné výměny plynů a agresivity použití IPPV (zajištění oxémie je dáno hlavně dosažením vyšších tlaků v plicích, P<sub>mean</sub>; zajištění normokapnie pak zajištěním minimální minutové ventilace, VE). K překročení zavedených doporučení (P<sub>insp</sub> < 30 cmH<sub>2</sub>O; driving pressure < 15(17) cmH<sub>2</sub>O; VT < 6 ml/kg PBW; adekvátní PEEP dle optimální plicní compliance) docházelo často – a to jak z neznalosti/nepozornosti, tak vynuceně – zajištění minimální výměny plynů i při toleranci uznávaných limitů hypoxémie/hyperkapnie. Do rutinní praxe se dostalo měření ventilační drivu (P<sub>0.1</sub>, či klinický pohled + CVP swings jako náhrada měření transpulmonální tlaku pomocí esofageálního katetru).
- Těžká porucha výměny plynů (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) vedla k rutinnímu používání pronační polohy (prone position) i na odděleních, kde to nebylo zavedené. Ve známost vešly jak indikace (OI < 100 (150) mmHg), tak i doba v prone pozici (> 16 (12) hodin denně). Zaveden byl i koncept polohy na bříše u spontánní ventilace (awake prone), jehož účinnost je však sporná.
- ECMO. Pandemie vedla k „masivnímu“ použití ECMO (hlavně vvECMO), rozvoji stávajících a vzniku nových ECMO center, u některých i s možností si pro „nemocného dojet do referující nemocnice“ (retrieval system).

- Interference s ventilátorem či velké respirační úsilí vedly k nutnosti kombinované analgosedace ve vysokých dávkách (viz dále) také často k použití svalových relaxancií v intermitentním/kontinuálním modu s kontrolou / bez kontroly stupně relaxace (TOF).

### Kardiovaskulární

Avizovaný vysoký počet virových myokarditid jsme v praxi nezaznamenali (sledování však nebylo systematické). Nejčastěji jsme se v praxi potýkali s následky postižení plicního parenchymu (dysfunkce P srdce v důsledku prekapilární plicní hypertenze). Připomněli jsme si, že v terénu různých příčin plicní hypertenze (postižení plicního parenchymu při ARDS, mikrotrombotizace plic při hyperkoagulačním stavu u COVID-19, hypoxické a hyperkapnické plicní vazokonstrikci) není možné diagnózu akutní plicní embolizace stavět pouze na echokardiografických parametrech.

U několika z cca 300 hospitalizovaných nemocných na ARK FNUSA v letech 2020/2021 jsme řešili:

- Tachykardické poruchy srdečního rytmu (paroxymální FIS s ROK) – prognostický význam a management (resinuzace? rate control?) těchto poruch není zcela jasný a jednotný. Stejně jako nutnost navýšení antikoagulace u FIS přetrvávající několik dní/týdnů u ICU nemocných s obvykle zvýšeným rizikem krvácení.
- Bradykardické poruchy srdečního rytmu – u několika nemocných jsme museli použít dočasnou KS, žádný premorbidně netangovaný nemocný nepotřeboval definitivní KS.
- U několika nemocných se vyskytla závažná forma Takotsubo KMP.

Nemocní s těžkou formou COVID-19 potřebovali po úvodní stabilizaci BB k léčbě přetrvávající sinusové tachykardie. Zvláštní indikací bylo podávání BB k tlumení nativního srdečního výdeje (CO) u nemocných na ECMO v případě hyperkinetické cirkulace, kdy ECMO nezajistilo adekvátní výměnu plynů díky vysokému nativnímu CO.

### CNS

Poruchy CNS jsou vnímány jako negativní prediktivní faktor na ICU ve stále zvýšené míře. Těžká porucha výměny plynů, vyžadující dlouhodobou analgosedaci (a často i svalovou relaxaci) měla z hlediska CNS a za následek:

- Nutnost kombinované analgosedace ve vysokých dávkách. Paralelní podávání opiát/propofol/midazolam/alfa2 agonista – nejčastěji dexmedetomidin – se stalo spíše rutinou. Postupně doplňované perorální sedací, v našich podmínkách nejčastěji antipsychotika nové řady (kvetiapin).
- Přetrvávající sedaci i po vypnutí/snižování dávek po stabilizaci stavu (použití BZD – midazolamu). Nicméně naše pokusy se BZD vyhnout často skončily jejich znovuzavedením do medikace.
- Vysoký výskyt deliria po vyvedení z hluboké analgosedace.
- Vysoký počet CMP ischemických (prokoagulační stav) i hemoragických CMP (vyšší preventivní či plná antikoagulace u TEN/PE/ECMO).

### Ledviny/játra/střevo

- AKI velmi časté, průběh i incidence se (odhadem, přesná data nemáme) nijak nelišily od nekovidové doby.
- Nezaznamenali jsme těžká poškození/selhání jater, která jsou v literatuře zmiňována.
- Dysfunkce GIT (intolerance EN, paralytický ileus) byla rutinně spojena s těžkým stavem, několik nemocných prodělalo NPB s nutností operační revize (Oglivie syndrom, ischemie střeva).

### Koagulace

Virus SARS-CoV-2 má zvláštní afinitu k endotelu a jeho poškození způsobuje hyperkoagulační stav, který jsme u ostatních viróz (epidemie chřipky) nezaznamenali.

- Zaznamenali jsme řadu trombotických komplikací jak ve venózním (DK, HK u intravenózních katetrů), tak i arteriálním (trombózy radiální/brachiální arterie po kanylaci) řečišti.
- Za nepřímý důkaz pro zvýšenou mikrotrombotizaci ve tkáních považujeme

jeme nález vysokého plicního shuntu i u jinak poměrně lehce postižených plic, nález ischemických střev bez zjevného uzávěru velkých arterií či žil, vyšší hladiny volného Hb před napojením na ECMO – dr. Suk, nepublikovaná data).

Rutině jsme (v případě absence kontraindikací) používali vyšší dávky preventivní antikoagulace (např. 2x0,4 ml enoxaparinu s.c.), častěji než obvykle jsme měřili účinnost pomocí antiXa (kumulace LMWH u AKI), v případě UFH pomocí aPTT (či v případě nejasností antiXa kalibrovaným na UFH). V několika případech jsme diagnostikovali HIT – situaci jsme vždy zvládli podáváním fondaparínu.

## DALŠÍ OBLASTI IP

### Sekundární infekce/ATB

- Během pandemie selhával ATB stewardship – a to již od první linie, ATB byla podávána od počátku virového onemocnění, mj. také kvůli nepravdivým počátečním údajům pozitivního účinku azitromycinu. Lékaři nemocnic pokračovali v tomto trendu nemocné „krýt“ antibiotiky, častým důvodem byla nesprávná interpretace vysokého CRP (s nevyužitím potenciálu PCT). Byla často používána ATB záložní řady (carbapenemy, PIP/TAZ atd.) v primární ATB léčbě. To vedlo k selekci polyrezistentních kmenů a sekundárním plicním superinfekcím (PSAE, *Acinetobacter baumannii*, pro mě nově i *Enterococcus faecium*, které jsem dosud vždy považoval za kolonizaci). Častější použití BAL (než jsem na ICU zvyklí, obvykle postupujeme pomocí semikvantitativního stanovení bakterií v TA) odhalilo poměrně časté virové (hlavně HSV1) či méně časté aspergillové superinfekce.

- Poměrně častým vedlejším účinkem nadužívání ATB byl zvýšený výskyt CD colitis.

### Kauzální léčba

- Intenzivní péče se týká prakticky pouze podání kortikoidů (KS). Účinnost je potvrzena (hlavně u nemocných potřebujících UPV), diskutuje se o vyšší dávky. V praxi jsme se setkali s excesy vysokých dávek (i gramové dávky metylprednisolonu), které dle nás nemají opodstatnění a mohou představovat riziko.
- Použití dalších specifických léků, ve kterých vidíme jisté pozitivum, je většinou vázáno na stadia onemocnění mimo ICU (mAb, remdesivir), či je dle mého soudu ještě nutné ověřit (tocilizimab = blok receptoru IL6).
- V oblasti specifické léčby jsou lékaři vystaveni obrovskému množství často protichůdných informací. Je třeba zachovat chladnou hlavu.

### Průběh

- Intenzivisté – zvyklí reagovat akčně – si museli zvyknout na zdlouhavý průběh těžkých forem COVID-19, trvající mnohdy několik týdnů. To vyžadovalo obrovskou trpělivost, čas byl často vedle vyvarování se iatrogenních chyb jedním z rozhodujících uzdravujících faktorů.

### Organizace

- Vysoký počet nemocných vyžadující intenzivní péči v krátkém časovém období byl obrovskou výzvou pro vnitroustavní organizaci i spolupráci mezi různými zdravotnickými zařízeními a centrálním řízením na úrovni kraje a státu. Detailní rozbor této složité pro-

blematiky přesahuje rámec tohoto sdělení.

- Infekčnost nemocných znamenala práci ve ztížených podmínkách, náročnou psychicky i fyzicky (OOP).
- Rizikové překlady mezi ZZ odhalily přednosti tzv. retrieval systému, kdy si pracovníci ECMO center ve spolupráci s ZZS jezdí pro hraniční/nejtěžší nemocné přímo do referujících ZZ.

### Etika

- Ukázalo se, že ČR nemá právně zpracovanou problematiku zdravotní péče při omezení kritických zdrojů. V některých ZZ v nejpostiženějších oblastech (KVK) docházelo na selekci nemocných (poskytnutí/neposkytnutí UPV), ke které by za normálních podmínek nedošlo.
- V mnoha ZZ začal být více uplatňován postup dle schváleného dokumentu ČLK definující tzv. „marnou péči“.
- Kritická situace odhalila velké odhodlání zdravotnického personálu pomoci nemocným. A to i za cenu rizika pro své zdraví (infekce virem, vyčerpanost, vyhoření).

Pandemie viru SARS-CoV-2 a s ní spojeného onemocnění COVID-19 představuje obrovskou lekci pro organizaci i vlastní praxi intenzivní péče. Do budoucna je nutné se připravit, abychom další vlny nebo zcela nové vlny zvládli lépe než ty tři koronavirové v minulosti [1,2].

### Literatura

1. Arabi YM et al. How the COVID-19 pandemic will change the future of intensive care. *Intensive Care Med.* doi: 10.1007/s00134-021-06352-y.
2. Vincent JL et al. COVID-19: What we've done well and what we could or should have done better – the 4 Ps. *Crit Care* 2021;25:40. doi: 10.1186/s13054-021-03467-y.

# Hyperkoagulační stav při onemocnění COVID-19 – patofyziologie, diagnostika, klinické projevy, léčba

Gumulec J.

Klinika hematologie LF OU a FN Ostrava

## ÚVOD

Patofyziologie koagulopatie asociované s COVID-19 je názorným příkladem komplexního fenoménu, kterým imunotrombóza nepochybně je. Trombotický fenotyp závažné koagulopatie asociované s COVID-19 je kombinací trombotického postižení žil, tepen i mikrocirkulace. Často se rozvíjí navzdory antitrombotické profylaxi. V patogenezi se uplatňuje endotelopatie, jejíž intenzita a rozsah korelují se závažností onemocnění [1], související nerovnováha mezi excesivní expresí von Willebrandova faktoru (VWF) a klesající funkční kapacitou ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin 1 repeats 13) v arteriolách a kapilárách [2], vystupňovaná aktivace destiček a tvorba agregátů destiček s multimery VWF [2] nebo s monocytami, interakce destiček s neutrofilními granulocyty spouštějící uvolnění neutrofilních extracelulárních pastí [3], excesivní uvolňování cytokinů aktivujících mj. endotel a destičky, nekontrolovaná hyperaktivace komplementu zásadně přispívající k další aktivaci endotelu, mnohonásobnému zvýšení novotvorby trombinu a k vystupňované expresi tkáňového faktoru [4–6], protromboticky působící (auto)protilátky [7] a v neposlední řadě hypofibrinolýza [8].

## ENDOTELOPATIE

Po časně infekční fázi, kdy virus způsobující virovou pneumonii postupuje po vazbě na receptor angiotensin konvertujícího enzymu 2 (ACE2R) plicními epitelovými buňkami, se rozvíjí systémová zánětlivá odpověď. Z histopatologického průkazu endotelitidy a virových partikulí v endotelálních buňkách vy-

plývá, že endotel zde hraje zásadní roli. Aktivace endotelových buněk vede ke zvýšení exprese VWF na endotelu. Děje se tak u kriticky nemocných i u asymptomatických pacientů [1]. U kriticky nemocných je exprese VWF výrazně vyšší a pravidelně bývá spojena se zvýšením koncentrace solubilního P-selektinu a sCD40L, tedy s aktivací krevních destiček [1]. Systémová zánětlivá odpověď vede k poškození endotelových buněk, k trombům bohatých na destičky a fibrin a k selhání mikrocirkulace. V závažných případech lze navíc prokázat zvýšení koncentrace solubilního trombomodulinu (sTM), který je uvolňován z membrány endotelu až po poškození buňky. sTM může být prediktorem fatálního průběhu [1]. Díky uvolnění inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1) se aktivace endotelu podílí na hypofibrinolýze. Významnou roli v procesu aktivace endotelu hraje syndrom uvolnění cytokinů.

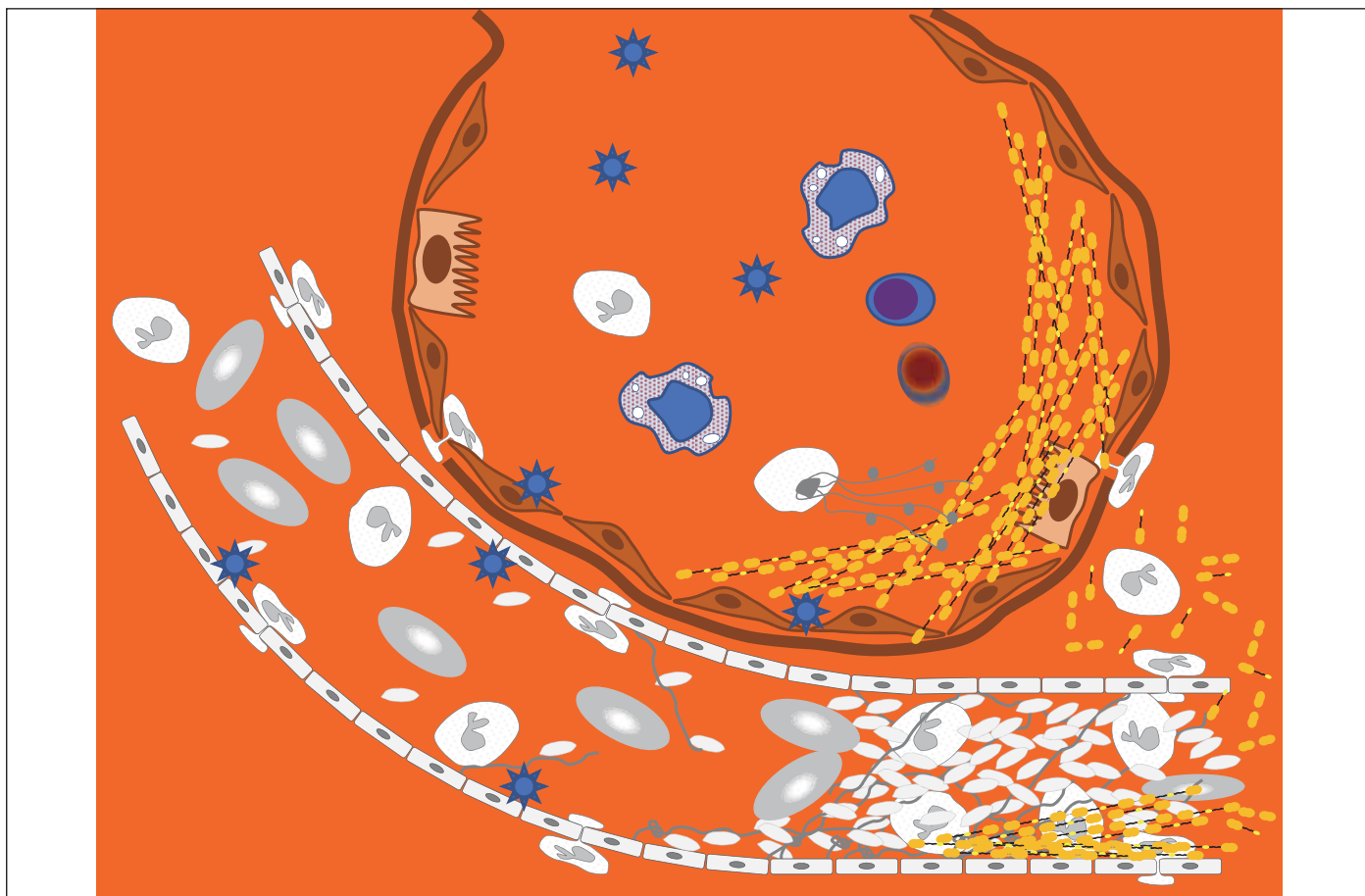
Zvýšení koncentrace VWF je spojeno s poklesem aktivity ADAMTS13 a nepoměr VWF/ADAMTS13 roste se závažností COVID-19 [2,9]. Interakce VWF s destičkami je závislá na prostředí s vysokým stříhovým napětím. Vysoká koncentrace VWF zvyšuje pravděpodobnost interakce s destičkami tím více, čím vyšší je počet trombocytů [2]. V prostředí vysoké koncentrace VWF a trombocytózy může narůstat proteolytická aktivita ADAMTS13. Vazba destičkového glykoproteinu Ibalfa na A1 doménu VWF vede ke konformační změně A2 domény VWF, což zvýší schopnost ADAMTS13 štěpit molekulu VWF. Přes rostoucí poměr VWF/ADAMTS13 Mancini I. a kol. neprokázali zvýšenou koncentraci ultra velkých multimerů VWF,

naopak našli zvýšený podíl středně velkých a malých multimerů VWF. Vysvětlení vidí v časném nastartování proteolýzy VWF [2]. Naopak Tureček P. L. a kol. u kriticky nemocných ultra velké multimery VWF prokázali [9]. Mechanismus poklesu aktivity ADAMTS13 není úplně jasný. Je možné, že excesivní uvolňování VWF vede ke konzumaci ADAMTS13 [2] nebo k sekvestraci ADAMTS13 ultra velkými multimery VWF [9]. Může souviset s cytokinovou bouří u COVID-19, protože cytokiny inhibují syntézu i aktivitu ADAMTS13. Snížení aktivity ADAMTS13 je prediktor horší prognózy.

U těžkých pacientů se v místě aktivace endotelu mění poměr koncentrace VWF, počtu destiček a aktivity ADAMTS13, což poskytuje podmínky pro vznik mikrotrombů. Tento proces se může šířit do vzdálených tkání a orgánů a vést k multiorgánovému selhání (MODS). Žádná klinická studie bohužel neprokázala efekt acetylsalicylové kyseliny na prognózu pacientů s COVID-19, nicméně dipyridamol, defibrotid, eculizumab a jiné endotel ovlivňující léky určitý terapeutický potenciál mají. Nepoměr VWF/ADAMTS13 s prokazatelným in vitro efektem rADAMTS13 upozorňuje na ambice tohoto léčiva upravit mikrocirkulaci pacientů s COVID-19 [9].

## AKTIVACE DESTIČEK A AGREGÁTY DESTIČEK S MONOCYTY

Aktivace destiček je u kriticky nemocných pacientů nezpochybnitelná [1]. Kromě adheze a agregace mohou aktivované destičky interagovat s dalšími buňkami, např. s neutrofilními granulocyty s uvolněním neutrofilních extracelulár-



Obr. 1. Poškození plic při COVID-19.

ních pastí a/nebo s monocyty s tvorbou agregátů a expresí tkáňového faktoru (TF) na membráně monocytů. P-selektin na povrchu aktivovaných destiček je hlavní protein odpovědný za adhezi destiček na monocyty a za spuštění signalizace vedoucí ke zvýšené expresi TF. Aktivace destiček a zvýšená exprese TF na monocitech zvyšuje generaci trombinu a predikuje špatnou prognózu včetně rozvoje závislosti na umělé plicní ventilaci. Tento fenomén lze *in vitro* inhibovat neutralizací destičkového P-selektinu nebo blokadou destičkového glykoproteinu IIb/IIIa abciximabem, zatímco acetylsalicylová kyselina ani klopidogrel tento účinek nemají.

### PROTILÁTKOVÁ AKTIVACE DESTIČEK A KOAGULACE U COVID-19

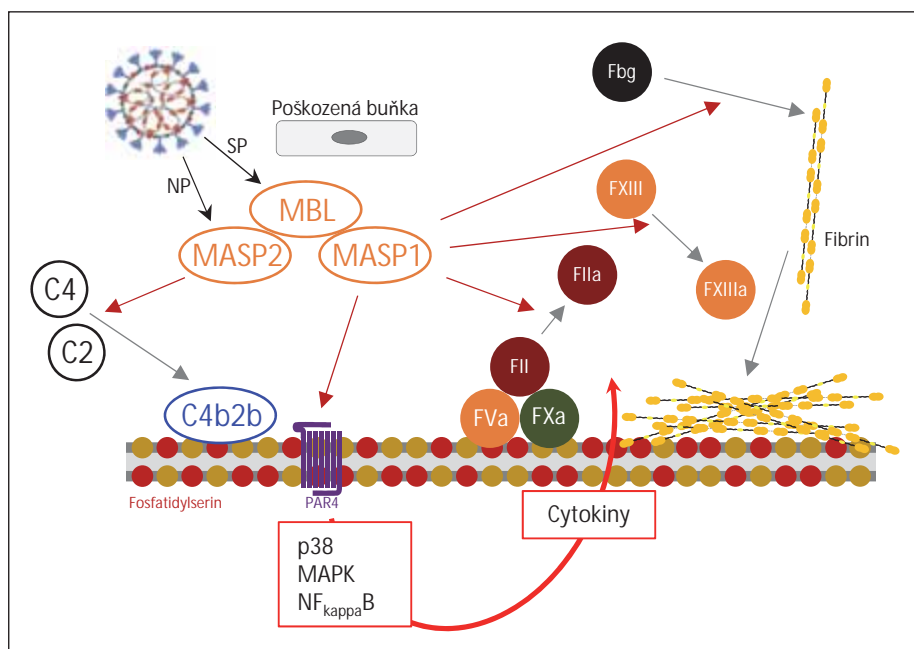
Existuje řada důkazů o souvislosti mezi těžkým akutním respiračním syndromem při infekci SARS-CoV-2 a produkcí

(auto)protilátek s širokým spektrem cílů. Děje se tak častěji u geneticky predisponovaných pacientů s polymorfismem genu lidského leukocytárního antigenu (např. HLA-DRB1) [7]. Při infekci vznikající imunoglobuliny třídy G mohou prostřednictvím destičkového Fc gama receptoru na povrchu destičkové membrány exprimovat P-selektin a startovat tak jejich prokoagulační aktivitu. V rámci imunitní reakce se mohou *de novo* objevit antifosfolipidové protilátky manifestované plnohodnotným antifosfolipidovým syndromem, silné protilátky cílené proti komplexu destičkový faktor 4 / heparin, které ale na rozdíl od podobných protilátek u heparinem indukované trombocytopenie nemívají schopnost aktivovat destičky, protilátky proti ADAMTS13 s rozvojem sekundární získané trombotické trombocytopenické purpury nebo naopak proti faktoru VIII s obrazem získané hemofilie typu A.

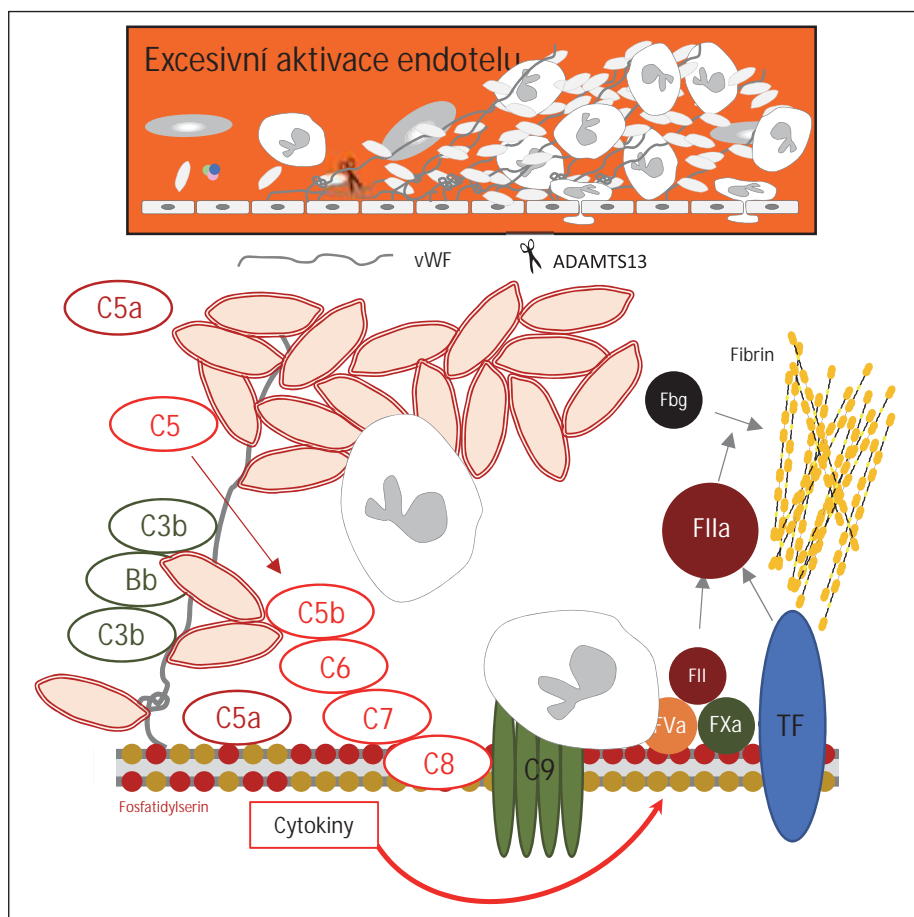
### NEUTROFILNÍ EXTRACELULÁRNÍ PASTI U COVID-19

V patogeneze imunotrombózy se kromě aktivovaného endotelu, destiček a koagulace podílí i aktivované leukocyty a dysregulace neutrofilních extracelulárních pastí (NETs). Neutrofilní granulocyty produkují NETs během regulované buněčné smrti procesem NETózy. NETs je trojrozměrná síť tvořená rozvolněným chromatinem posetým histony a antimikrobiálními proteiny. A priori bývá uvolňovaná po stimulaci s cílem zbavit se patogenů. Je-li NETóza spouštěna aktivovanými destičkami, může ztratit regulaci a vést k poškození tkání a k trombóze. Destičkový faktor 4 (PF4) uvolňovaný z aktivovaných destiček se váže na NETs, zvyšuje jejich denzitu a rezistenci na DNázy. Uvolňovat se může i z destiček zachycených na NETs a pozitivní zpětnou vazbou uzavírat smyčku patologie komplexu PF4/NETs. Podíl





Obr. 2. Interakce lektinové cesty aktivace komplementu a koagulace.



Obr. 3. Interakce alternativní cesty aktivace komplementu a koagulace.

NETózy je dobře zdokumentován u pacientů se sepsí a syndromem akutní respirační tísně (ARDS). Intenzita NETózy koreluje s tíží ARDS a s rozvojem MODS

i u pacientů s COVID-19, tzn. může predikovat závažnost nemoci. Je možné, že interakce NETs s aktivovanými destičkami je jedním z mechanismů rezistence

na standardní profylaktické dávky heparinu [3]. NETóza může být inhibována neonatálním NETs inhibujícím faktorem z pupečnickové krve [3], dipyridamolem nebo DNázou (obr. 1).

### KOMPLEMENT U COVID-19

Mikrovaskulární trombóza bývá u těžkých COVID-19 pacientů spojena se zvýšením aktivity LDH a koncentrace feritinu a podobá se trombotické mikroangiopatii, nejvíce komplementem mediovánému hemolyticko-uremickému syndromu (hUS) [4], kde je díky mutacím genů regulačních proteinů komplementu vystupňovaná nebo dysregulovaná aktivace komplementu. Mnohé manifestace COVID-19 jsou zprostředkované excesivní aktivací alternativní (AP), lektinové (LP) i klasické cesty (CP) komplementu iniciované přímo povrchovými strukturami viru a/nebo infikovanými/poškozenými buňkami:

- Přímé poškození endotelových buněk invazí SARS-CoV-2 je zprostředkované ACE-2 receptorem exprimovaným na epitelu dýchacích cest, endotelu a monocytech – start protrombotického a prozánětlivého fenotypu odhalením DAMPs (damage-associated molecular patterns – DAMPs),
- N-glykosylace spike proteinu SARS-CoV-1 umožní vazbu a aktivaci manózu vázajícího lektinu (MBL) a nukleokapsidový protein (N-protein) váže MASP-2 (MBL asociovaná serinová proteáza 2) – dvě cesty aktivace LP [6],
- Spike protein SARS-CoV-2 (podjednotka 1 a 2) přímo aktivuje/dereguluje AP [5].

Všechny tyto cesty vedou k imunitní trombóze. MASP 1 a 2 přímo aktivují protrombin, mění fibrinogen na fibrin, zvyšují aktivitu FXIII a aktivují proteázami aktivovaný receptor (PAR) mj. na membráně destiček a endotelových buněk. C5a složka komplementu aktivuje destičky, indukuje expresi TF na endotelu a monocytech, potlačuje expresi protektivních antitrombotických proteinů a indukuje expresi P-selektinu na destičkách.

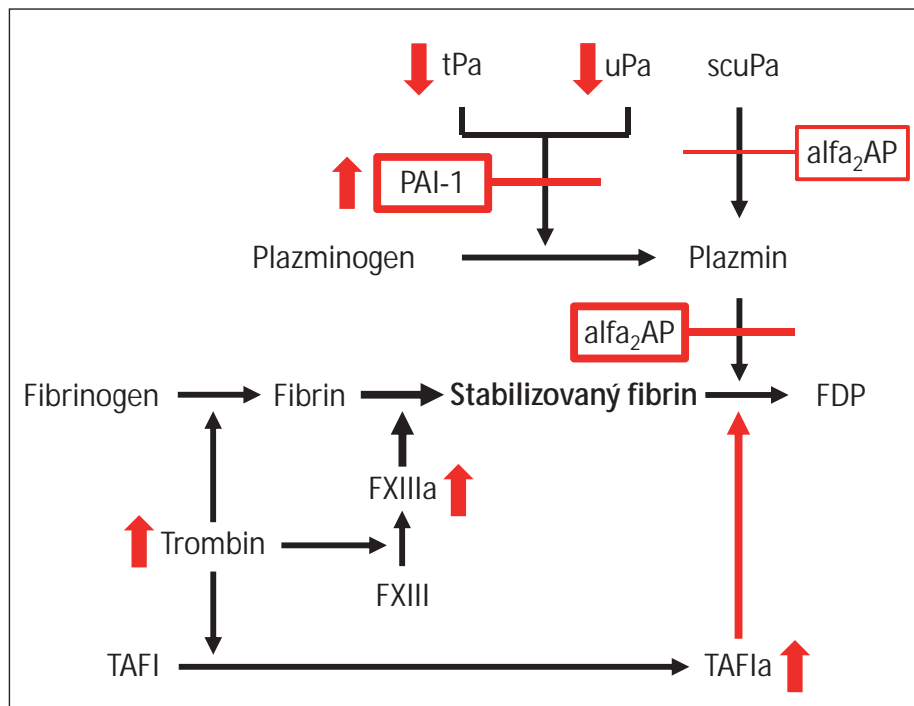
Následně vzniklý komplex C5b-7 expri- muje monocytární TF a terminální kom- plex mj. aktivuje destičky, endotelové buňky a dále posiluje prokoagulační akti- vitu TF. Aktivovaný trombin a TF zpětnou vazbou aktivují komplement, čímž se cir- culus vitiosus uzavírá. Je možné, že se ně- které proteiny SARS-CoV-2 po lýze infi- kovaných buněk uvolňují do krve a dále aktivují komplement a trombogenezi [6], že podobně jako trombin, plazmin a další serinové proteázy mohou proteázy kó- dované SARS-CoV-2 štěpit C3 a/nebo C5 a dále eskalovat efekt aktivovaných složek komplementu v trombogenezi. Proteiny kódované SARS-CoV-2 mohou vázat, štěpit, inaktivovat inhibitory kom- plementu a zvýšit míru deregulace akti- vovaného komplementu. Je možné, že rozdíly v závažnosti nemoci souvisí s pří- tomností mutací genů regulačních pro- teinů komplementu podobně, jako tomu je u cHUS [10]. Nitrobuňčná akti- vace komplementu navozená rozštěpe- ním C3 a C5 vede k silné prozánětlivé od- povědi s masivním uvolněním cytokinů např. IL-6, IL-1beta a TNFgamma (obr. 2 a 3).

## CYTOKINOVÁ BOUŘE

Těžký průběh COVID-19 vede k syn- dromu uvolnění cytokinů (CRS) a jeho léčba imunomodulátory nebo antago- nisty cytokinů je významnou částí kom- plexní péče zvyšující přežití. Aktivované makrofágy intraalveolárně produkují cy- tokiny, které přitahují a aktivují další mo- nonukleáry a neutrofile, spouštějí sys- témovou aktivaci endotelu, redukují protektivní vlastnosti endotelu, aktivují destičky a jejich tvorbu, startují syn- tézu koagulačních faktorů, aktivují ces- tou TF zevní cestu koagulační kaskády a vedou k poškození i vzdálených tkání a k MODS. Výsledek je nerovnováha na- přič Vichowovou triádou.

## HYPOFIBRINOLÝZA A ZVÝŠENÁ GENERACE TROMBINU

Asi třetina pacientů s těžkým průběhem COVID-19 má přes standardní trombo- profylaxi trombózy. Většina z nich má



Obr. 4. Hypofibrinolýza u koagulopatie asociované s COVID-19.

vedle vystupňované generace trombinu poruchy fibrinolýzy (vysoká aktivita akti- vátoru plazminogenu tkáňového typu – tPa převážena inhibiční aktivitou inhibi- toru aktivátoru plazminogenu 1 – PAI-1, zvýšení trombinem aktivovaného inhibi- toru fibrinolýzy – TAFI). Zvýšení aktivity tPa a PAI-1 souvisí s aktivací endotelu a zvýšení aktivity TAFI s intenzivní ge- nerací trombinu. Významným zdrojem PAI-1 jsou kromě endotelu cirkulující destičky, které uvolňují PAI-1 v prostředí na destičky bohatých (mikro)trombů. Zatímco v prostředí relativně nízké kon- centrace trombinu vzniká řídká fibrinová síť tlustých vláken citlivá na fibrinolýzu, v prostředí vysoké koncentrace trom- binu vzniká hustá síť tenkých vláken fib- rinu fibrinolýze odolávající. Díky vysoké novotvorbě trombinu dochází k hy- peraktivaci FXIII s tvorbou odolné fibri- nové sítě. Zvýšená plazmatická aktivita PAI-1 je nezávislý rizikový faktor špatné prognózy a mortality.

Hypofibrinolýza vede díky zvýšené intraalveolární koncentraci TAFI, alfa2- makroglobulinu a PAI-1 (a souvisejícího útlumu urokinázy – uPa) k intraalveolár- ním depozitům fibrinu, jejichž objem ko- responduje s rozvojem ARDS a spolu se

sekvestrací leukocytů (zvláště neutrofil- ních granulocytů a monocytů) se podílí na tvorbě hyalinních membrán a alveo- lární fibrózy (obr. 4).

Zatímco antikoagulační léčba může kontrolovat šíření depozit fibrinu v mi- krocirkulaci, hepariny nedokážou od- stranit intraalveolární depozita fibrinu. Inhalace antitrombinu, heparinu nebo fibrinolytika zdá se může zamezit pro- gresi intraalveolárních fibrinových de- pozit bez nárůstu rizika hemoragických komplikací. Systémová fibrinolýza bývá spojena s rizikem krvácení.

## KRVÁCENÍ U COVID-19

Závažných krvácení se u pacientů s COVID-19 vyskytuje dvakrát méně než trombózy, a přesto je u krvácivých kompli- kací mortalita mnohem větší. Dvě třetiny závažných krvácivých epizod se nejčas- těji objevuje u pacientů s terapeutickou antikoagulací ve druhém nebo třetím týdnu hospitalizace. Ve fázi vystupňo- vané zánětlivé odpovědi bývá díky feno- ménu rezistence na heparin často nutné zvyšovat jeho dávku. Více než polovina těžkých krvácení se objevuje při odezní- vání zánětu, kdy se heparin méně váže na ustupující reaktanty akutní fáze a více

na antitrombin. Tím roste jeho antikoagulační účinek i riziko krvácení. Monitorování antikoagulačního efektu UFH pomocí aktivovaného parciálního trombotického času není v době proměnlivé systémové zánětlivé odpovědi spolehlivé a preferováno je anti-Xa. Dalším mechanismem proměny protrombotického nastavení v trombohemoragické může být spotřeba FXIII. Při vystupňovaném obratu FXIII při excesivní generaci trombinu může dojít ke konzumpci FXIII v rozsáhlém objemu trombotizované mikrocirkulace.

## ZÁVĚR

Koagulopatie u COVID-19 je příkladem komplexního fenoménu imunotrombózy. Nemá charakter diseminované intravaskulární koagulopatie jak ji známe třeba u bakteriálních infekcí. To vyžaduje

respekt při rozhodování o strategii laboratorní diagnostiky a terapie.

## Literatura

1. Goshua G, Pine AB, Meizlish ML, et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol* 2020;7(8):e575–e582. doi: 10.1016/s2352-3026(20)30216-7.
2. Mancini I, Baronciani L, Artoni A, et al. The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients. *J Thromb Haemost* 2021;19(2):513–521. doi: 10.1111/jth.15191.
3. Middleton EA, He XY, Denorme F, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* 2020;136(10):1169–1179. doi: 10.1182/blood.2020007008.
4. Magro C, Mulvey JJ, Berlin D, et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases. *Transl Res* 2020. doi: 10.1016/j.trsl.2020.04.007.
5. Yu J, Yuan X, Chen H, et al. Direct activation of the alternative complement pathway by SARS-

-CoV-2 spike proteins is blocked by factor D inhibition. *Blood* 2020;136(18):2080–2089. doi: 10.1182/blood.2020008248.

6. Gao T, Hu M, Zhang X, et al. Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates lung injury by MASP-2-mediated complement over-activation. medRxiv 2020:2020.2003.2029.20041962. doi: 10.1101/2020.03.29.20041962.
7. Halpert G, Shoenfeld Y. SARS-CoV-2, the autoimmune virus. *Autoimmun Rev* 2020;19(12):102695. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102695.
8. Nougier C, Benoit R, Simon M, et al. Hypofibrinolytic state and high thrombin generation may play a major role in SARS-COV2 associated thrombosis. *J Thromb Haemost* 2020;18(9):2215–2219. doi: 10.1111/jth.15016.
9. Turecek PL, Peck RC, Rangarajan S, et al. Recombinant ADAMTS13 reduces abnormally up-regulated von Willebrand factor in plasma from patients with severe COVID-19. *Thromb Res* 2021;201:100–112. doi: 10.1016/j.thromres.2021.02.012.
10. Conway EM, Pryzdial ELG. Is the COVID-19 thrombotic catastrophe complement-connected? *J Thromb Haemost* 2020. doi: 10.1111/jth.15050.

# Výroba a použití rekonvalescentní plazmy pro léčbu onemocnění COVID-19

Bohoněk M.

Oddělení hematologie a krevní transfuze, Praha  
Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha

Výroba rekonvalescentní plazmy (RP) od osob, které prodělaly onemocnění COVID-19, se v době pandemie infekce novým koronavirem SARS-CoV-2 stala zvláštní a novou kapitolou v léčbě infekčních onemocnění a transfuzní služby v řadě zemí, vč. České republiky, i když se jedná o postup známý již více než 100 let.

Při náhlém vzplanutí epidemie nové virové infekce, která zasáhne rozsáhlou populaci vnímavých osob, není v prvních měsících až letech možná cílená léčba a profylaxe onemocnění do té doby, dokud není k dispozici specifická antivirová terapie nebo vakcína. Typickým případem je pandemie in-

fekce novým typem koronaviru SARS-CoV-2. Kauzální léčba, profylaxe i prevence tohoto infekčního onemocnění jsou stále předmětem diskuzí, výzkumů a sbírání zkušeností z konkrétní klinické praxe při ošetřování pacientů. Zatímco se terapeutické a profylaktické postupy ve srovnání s počátkem roku 2020 významně posunuly podáváním monoklonálních protilátek a rozsáhlou vakcinací, na dobré cestě je i výroba specifických antivirotik.

Jednou z velmi rychle dostupných léčebných alternativ bylo podání RP, tj. krevní plazmy získané od osob, které prodělaly COVID-19. Podání anti-SARS-CoV-2 protilátek obsažených v této

plazmě představuje způsob pasivní specifické imunizace s očekávatelnou léčebnou odpovědí. Zkušenosti z předchozích epidemických nárazů způsobených koronaviry SARS-CoV-1 a MERS-CoV naznačovaly, že RP obsahuje neutralizační protilátky proti příslušnému viru, které jsou pravděpodobně hlavním zdrojem jejího léčebného potenciálu. Nelze ovšem vyloučit ani další imunitní mechanismy, jako jsou protilátkami indukovaná buněčná cytotoxicita a/nebo fagocytóza [1–6].

Plazma odebraná pacientům, kteří se zotavili z infekčního onemocnění, byla v minulosti mnohokrát s úspěchem používána pro profylaxi nebo léčbu

řady infekčních onemocnění, i když důkazy o účinnosti a bezpečnosti tohoto postupu byly dosud většinou omezeny pouze na empirické zprávy [7]. Ještě delší tradici má terapeutické použití tzv. hyperimunního séra, které bylo od konce 19. století až do nástupu éry antibiotik používáno k prevenci a léčbě řady bakteriálních infekcí (např. záškrtu, pneumokokových a meningokokových infekcí) i virových infekcí (např. spalniček, příušnic apod.). Specifické imunoglobuliny jsou do dnešní doby účinnou terapií a profylaxií mnoha virových onemocnění jako jsou vzteklna, hepatitidy A i B, kongenitální cytomegalovirová infekce a další [8]. První rozsáhlejší použití RP bylo popsáno v období pandemie španělské chřipky (H1N1) v letech 1918–1920 a s jejím použitím bylo uváděno snížení smrtelnosti chřipkové pneumonie [9]. Z posledních epidemických onemocnění před pandemií SARS-CoV-2 se RP používala k léčbě virové horečky ebola, blízkovýchodního respiračního syndromu, ptačí chřipky, pandemické chřipky H1N1 a infekce SARS-CoV-1 [10–12]. V Argentině je RP dokonce léčebným standardem v péči o pacienty s hemoragickou horečkou vyvolanou virem Junin s popisovanou prevencí až 90 % úmrtí [13].

Na základě těchto zkušeností s léčbou rekonvalescentní plazmou (sérem) byl očekávaný předpoklad léčebného účinku RP ve formě pasivní imunizace pacientem/dárce vytvořenými protilátkami proti SARS-CoV-2. Skutečnost, že očekávání bylo opravdu veliké, potvrzuje řada zahraničních programů výroby a použití RP, kde v řadě zemí se odběry a výroba RP staly národním a vysoce podporovaným programem. V USA byla výroba a léčba RP metodicky řízena a průběžně vyhodnocována Mayo Clinic v Minnesotě. Ve velmi nadějně multicentrické studii ze srpna 2020 byla zhodnocena léčba RP u 35 322 pacientů v 2 807 nemocnicích. Analyzovaná data potvrdila bezpečnost terapie RP i pozitivní efekt na přežití pacientů s COVID-19. Mimo jiné byl potvrzen jednoznačný

přínos včasného podání RP, kdy 7denní letalita u kriticky nemocných, kteří obdrželi RP během 3 dnů od diagnózy, byla 8,7 % ve srovnání s 11,9 % u pacientů, kteří RP obdrželi 4 a více dní po diagnóze. Podobné výsledky byly zaznamenány i u 30denního přežití (21,6 vs. 26,7 %). Jako důležitý faktor se potvrdila i koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2 třídy IgG obsažených v RP, kdy jejich vyšší hladina měla signifikantní vliv na přežití [14]. Tyto zkušenosti byly potvrzeny argentinskou randomizovanou a dvojitě zaslepenou studií, která na vzorku 160 pacientů prokazuje, že včasné podání RP (do 3 dnů) s dostatečným titrem virus neutralizačních protilátek zamezuje rozvinutí závažné a nezvratitelné formy onemocnění [15]. Výroba a léčba RP byla podporovaná i ze strany EU průběžně vydávaným, resp. aktualizovaným, doporučením [16].

Na druhou stranu se oproti optimistickým zprávám stále častěji objevovaly studie, které účinnost RP při léčbě onemocnění COVID-19 zpochybňovaly, resp. neprokazovaly její terapeutický přínos [17,18]. Zejména pak multicentrická randomizovaná studie RECOVERY, provedená vyhodnocením léčby na robustním vzorku 16 278 pacientů ve Velké Británii v období květen 2020 až leden 2021, neprokázala rozdíl v přežití 28 dnů u pacientů s COVID-19 léčených RP ve srovnání s pacienty bez této léčby [19]. Nedostatek evidence pro použití RP v léčbě COVID-19 začínal být stále více zřejmý.

V České republice byla výroba RP od osob, které prodělaly onemocnění COVID-19, zahájena koncem března 2020 a v dubnu 2020 byla RP transfundována prvním pacientům [20]. Klinická skupina COVID MZ ČR již 27. 3. 2020 publikovala doporučený postup. Specifická léčba dospělých pacientů s infekcí COVID-19, kde podání RP bylo uvedeno spolu s Remdesivirem mezi postupy „ke zvážení“ a doporučováno pouze u těžkých průběhů.

Dne 30. 4. 2020 byl vydán speciální multioborový Doporučený postup pro

použití RP v léčbě dospělých pacientů s COVID-19, který se ve svém indikačním doporučení v souladu s mezinárodními zkušenostmi lišil tím, že upozorňoval na účinnost RP (spíše profylakticky než léčebně) a na dosud nedostatečnou EBM pro účinné použití RP a že definoval základní klinické ukazatele pro sledování účinnosti a bezpečnosti léčby. V příloze 3 tohoto doporučení byly uvedeny postupy a kritéria pro odběr RP a její specifikace, RP byla v té době čerstvě uvedena jako regulérní transfuzní přípravek v OOP SÚKL a měla stanovenou úhradu (Plasma rekonvalescentní a Plazma rekonvalescentní patogen-inaktivovaná). Minimální hodnota titru virus neutralizačních protilátek byla stanovena na 320 a doporučené dávkování se ustálilo na obvyklých 2 T.U., resp. 4–6 ml/kg.

Do výroby RP se v průběhu let 2020–2021 postupně zapojilo celkem 24 zařízení transfuzní služby (ZTS), která si musela poradit s tímto poměrně náročným organizačním i logistickým problémem. Obtížnost spočívala již v samotném náboru vhodných dárců, které zpravidla bylo nutné nalézt mimo zavedené databáze transfuzní služby. Největší problém ale představovalo vyšetření protilátkové odpovědi u dárců, kdy základní test stanovení virus neutralizačních protilátek (VNT – virus neutralizační test) byl jen velmi obtížně dostupný (pouze ve 4 specializovaných laboratořích splňujících podmínky BSL 3–4) a jeho doplnění nebo dokonce náhrada komerčním sérologickým testem představovalo velkou odbornou výzvu. Praxe se ve většině ZTS nakonec ustálila tak, že vytipovaný dárců byl nejprve pozván na tzv. prescreening sérologickým testem a teprve při jeho určité hodnotě byl pozván na vlastní odběr s následným vyšetřením VNT nebo zvoleným vhodným sérologickým testem. Až 30 % potenciálních dárců, kdy všichni měli prokázanou pozitivitu v PCR SARS-CoV-2 testu, tomuto prescreeningu nevyhovělo z důvodu buď úplné absence nebo velmi nízké hodnoty laboratorně měřitelných protilátek. Pool dárců se navíc musel průběžně

obnovovat, protože hladina protilátek zpravidla po 3 měsících u většiny dárců klesala pod přijatelnou mez. Na druhou stranu je vhodné zdůraznit, že altruismus a ochota potenciálních dárců po prodělání onemocnění COVID-19 byla napříč republikou velká, a i jim patří dík za úspěch tohoto programu.

Dne 13. 10. 2020 byla vydána verze 2 Doporučeného postupu pro použití RP v léčbě dospělých pacientů s COVID-19 s již jasně definovanou indikací podání RP co nejdříve, optimálně do 3 dnů od vzniku klinických příznaků, s tím, že před podáním by měla být u pacienta ověřena přítomnost protilátek proti SARS-CoV-2. Při pozitivním nálezu je podání RP neindikované a byly upřesněny sledované ukazatele klinického výsledku. Byla též upřesněna specifikace RP v tom smyslu, že minimální titr virus neutralizačních protilátek byl stanoven na 160. Poslední doporučení, „Mezioborové stanovisko k podání RP u pacientů s COVID-19“ z 2. 3. 2021, se soustředilo hlavně na indikační kritéria s důrazem na včasné podání u středně těžkých případů jako prevenci rozvoje závažného průběhu.

V současné době (jaro 2021) program výroby a použití RP již prakticky skončil, o účinnosti RP v léčbě onemocnění COVID-19 se stále vedou diskuse a je nutno konstatovat, že RP se nikdy nestala doporučenou specifickou léčbou onemocnění COVID-19, podpořenou dostatečnou evidencí, ale vždy zůstala v rovině léčby experimentální, „ke zvážení“. V období duben 2020 až duben 2021 bylo v ČR vyrobeno celkem 19.079 T.U. RP ve 24 ZTS a z tohoto vyrobeného množství bylo vydáno 14.197 T.U. pro cca 7 100 pacientům v 61 nemocnicích. Z celkového počtu 131 000 hospitalizovaných pacientů s COVID-19 za dané období v ČR byla rekonvalescentní plazma podána jako léčba 5,4 % hospitalizovaných pacientům.

Aktuálně v ČR probíhá sběr dat k retrospektivní studii RESOVID-19 (Retrospektivní studie účinnosti a bezpečnosti rekonvalescentní plazmy anti-SARS-

-CoV-2 při léčbě onemocnění COVID-19), kterou zpracovala ÚVN Praha a ke které se dosud přihlásilo cca 10 dalších nemocnic. Záměrem studie je ověřit nebo vyloučit účinnost RP a její případný vliv na výskyt nežádoucích událostí u pacientů. Primárním cílem je zhodnocení efektivity RP oproti souběžné kontrolní skupině bez léčby v závislosti na tíži průběhu COVID-19 v době podání RP nezávisle na době trvání příznaků COVID-19 před podáním RP u skupiny hospitalizovaných pacientů starších 18 let s tíží průběhu 3 až 6 dle stupnice ACTT, kteří nemají FRAILTY skóre vyšší než 6. Kromě toho jsou ve studii definované dílčí výzkumné cíle, jako četnost nozokomiálních infekcí po podání RP, rozsah poškození plic u pacientů s podanou RP oproti kontrolní skupině, dynamika poškození, smrtnost a přežití dle doby od pozitivního PCR testu do doby podání RP a smrtnost a přežití dle hodnoty titru VNT podané RP. Předpokládaný termín dokončení sběru dat a jejich vyhodnocení je podzim 2021.

## Literatura

1. Woo PCY, Lau SK, Wong BH, et al. Longitudinal Profile of Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA Antibodies against the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein in Patients with Pneumonia Due to the SARS Coronavirus. *Clin and Diag Lab Immunology* 2004;11:665–668.
2. Cheng Y, Wong R, Soo YO, et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:44–46.
3. Yeh KM, Chiueh TS, Siu LK, et al. Experience of using convalescent plasma for severe acute respiratory syndrome among healthcare workers in a Taiwan hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:919–922.
4. Zhang JS, Chen JT, Liu YX, et al. A serological survey on neutralizing antibody titer of SARS convalescent sera. *J Med Virol* 2005;77:147–150.
5. Arabi YM, Hajeer AH, Luke T et al. Feasibility of using convalescent plasma immunotherapy for MERS-CoV infection, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis* 2016; 22:1554–1561.
6. Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis* 2015;211:80–90.

7. Garraud O, Heshmati F, Pozzetto B, et al. Plasma therapy against infectious pathogens, as of yesterday, today and tomorrow. *Transfus Clin Biol* 2016;23:39–44.
8. Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:695–703.
9. Luke TC, Kilbane EM, Jackson JL, Hoffman SL. Meta-analysis: convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment? *Ann Intern Med* 2006;145:599–609.
10. Hung IF, To KK, Lee CK, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis* 2011;52:447–456.
11. World Health Organisation. Use of Convalescent Whole Blood or Plasma Collected from Patients Recovered from Ebola Virus Disease for Transfusion, as an Empirical Treatment during Outbreaks, WHO Interim Guidance for National Health Authorities and Blood Transfusion Services, Version 1.0, September 2014, WHO/HIS/SDS/2014.8. Dostupné na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/135591>.
12. Sahr F, Ansumana R, Massaquoi TA et al. Evaluation of convalescent whole blood for treating Ebola Virus Disease in Freetown, Sierra Leone. *J Infect* 2017;74:302–309.
13. Enria DA, Maiztegui JI. Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 1994;23:23–31.
14. Joyner MJ, Senefeld JW, Klassen SA et al. Effect of Convalescent Plasma on Mortality among Hospitalized Patients with COVID-19: Initial Three-Month Experience. Preprint. medRxiv 2020; 2020.08.12.20169359.
15. Libster R, Pérez Marc G, Wappner D, et al. Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults. *N Engl J Med*. 2021;NEJMoa2033700. doi: 10.1056/NEJMoa2033700.
16. European Commission. An EU Programme of COVID-19 convalescent plasma collection and transfusion. Dostupné na: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/blood\\_tissues\\_organs/docs/guidance\\_plasma\\_covid19\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/blood_tissues_organs/docs/guidance_plasma_covid19_en.pdf).
17. Simonovich VA et al. A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia. *N Engl J Med* 2021; 384:619–623, doi: 10.1056/NEJMoa2031304.
18. Agarwal A et al. Convalescent plasma in the management of moderate covid-19 in adults in India: open label phase II multicentre randomised controlled trial (PLACID Trial). *BMJ* 2020;371:m3939. doi: 10.1136/bmj.m3939.
19. RECOVERY Collaborative Group, Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial. *Lancet* 2021;397:2049–2059.
20. Bohoněk M, Řezáč D, Holub M. Výroba a použití rekonvalescentní plazmy pro léčbu COVID-19 s přihlédnutím ke zkušenostem v ÚVN Praha, *Čas. Lék. čes.*, 2020;159:175–180.

# Vakcinace proti viru SARS-CoV-2 u pacientů s nádorovým a nenádorovým hematologickým onemocněním a dárců krve / krvetvorné tkáně

**Beran O.**

*Klinika infekčních nemocí 1. LF UK a ÚVN v Praze*

Pandemie infekčního onemocnění COVID-19 přinesla v roce 2020 vzhledem ke své závažnosti a celosvětovému dopadu urgentní potřebu vývoje nových antivirotik a vakcín. Ačkoli tento proces trvá obvykle řadu let až desetiletí, podařilo se již během prvního roku pandemie zavést do klinické praxe několik léčiv a v bezprecedentně krátké době byly uvedeny do praxe první účinné vakcíny. Onemocnění COVID-19 je asociováno s výrazně vyšší smrtností u pacientů s hematologickými malignitami přesahující 30 %. Navíc tito pacienti vylučují virus delší dobu a mohou být zdrojem nových variant. Očkování proti viru SARS-CoV-2 tak logicky představuje klíčově důležitou a efektivní cestu, jak zamezit závažným průběhům a úmrtím na nemoc COVID-19.

Pacienti s imunodeficientními stavy vč. hematologických malignit a osoby na imunosupresivní léčbě byli vyloučeni z klinických studií vedoucích ke schválení vakcín v současné době používaných v EU – Comirnaty (Pfizer-BioNTech), Moderna, Vaxzevria (dříve AstraZeneca) a vakcína Janssen. Imunogenicita ani bezpečnost u těchto rizikových skupin nebyla zpočátku známa a data jsou získávána postupně z observačních klinických studií. Současná doporučení tak zatím nemají oporu v kvalitních důkazech a jsou založena na omezeném množství dostupných údajů, zkušenostech z jiných vakcinací a konsenzuálních názorů expertů. Dosud publikované výsledky naznačují, že účinnost vakcinace u závažně hematologicky nemocných pacientů může být významně snížena. Studie Mounzera et al. např. zjistila ve

skupině 67 pacientů s hematologickou malignitou produkci protilátek po očkování 2 dávkami mRNA vakcíny pouze u 54 % osob. U pacientů s B-CLL mělo pouze 23 % detekovatelné protilátky. Přesto z dosavadního průběhu vakcinační kampaně vyplývá, že vakcinace je vhodná jak u pacientů s hematologickými malignitami, tak u většiny pacientů s nenádorovými chorobami krve a krevního srážení. Vždy je ovšem žádoucí, aby součástí rozhodování o očkování byla konzultace pacienta a ošetřujícího specialisty se zvážením všech přínosů i potenciálních rizik a odstranění případných obav z vakcinace. Co se týče nenádorových onemocnění krvetvorby patří mezi ohrožené nemocí COVID-19 zejména pacienti s hemoglobinopatiemi či autoimunními hemolytickými anémiemi, kteří vykazují horší průběh a prognózu nemoci. Proto se předpokládá, že přínos vakcinace převažuje možné riziko zhoršení hematologického onemocnění, byť i v tomto případě dosud chybí důkazy z klinických studií. Podobně u pacientů s trombocytopenickými stavy a poruchami destiček je třeba zvážit vyšší riziko komplikací spojených s COVID-19 oproti vzácným nežádoucím účinkům vakcinace. Očkovat by se standardně měli i pacienti s asplenií či funkčním hyposplenismem, byť nepatří dle dostupných údajů mezi nejrizikovější skupiny.

U imunosuprimovaných pacientů lze očekávat sníženou odpověď humorální i buněčné imunity na vakcínu proti COVID-19 a v důsledku méně kvalitní a krátkodobější protekce podobně jako u jiných virových infekcí. V současnosti není stanoven jednoznačný ko-

relát ochrany před virem SARS-CoV-2, a přestože lze v rámci monitoringu provést vyšetření hladin imunoglobulinů v séru, jeho výsledek má zatím klinický dopad na rozhodování velmi omezený. Z těchto důvodů je velmi důležité pacientům připomínat riziko infekce i po vakcinaci a očkovat také rodinné příslušníky, blízké kontakty a personál pečující o tyto pacienty.

Riziko přenosu infekce SARS-CoV-2 krevní transfuzí je stále pouze teoretické. Dárcovství krve tak nepředstavuje u osob po prodělané infekci ani u očkováných jedinců žádnou komplikaci. Vakcíny na principu mRNA i virových vektorů se v organizmu rychle rozpadají a není žádný důkaz, že by transfuzní přípravky představovaly riziko pro příjemce. Podobně jako u jiných neživých vakcín, ani po vakcinaci proti COVID-19 není nutný žádný časový interval před krevním odběrem, nicméně alespoň týdenní odstup je vhodné vzhledem k možným nežádoucím účinkům očkování dodržet. Po prodělané infekci SARS-CoV-2 je možné krev či její složky darovat za 14 dní po uzdravení nebo konci izolace. V léčbě onemocnění COVID-19 v jeho časně fázi lze nadále využít rekonvalescentní plazmu od dárců po prodělané infekci nehledě na vakcinační status obsahující širší spektrum protilátek proti virovým antigenům oproti osobám pouze očkováným.

Vývoj vakcín proti COVID-19 je zatím mimořádně úspěšný závod. V květnu 2021 bylo ve světě schváleno ke klinickému využití 8 vakcín, z nichž zejména inovativní mRNA vakcíny překvapily

svou vysokou účinností a bezpečností. Nakolik je ovšem tato vakcínou navozená imunitní odpověď snižena u rizikových a oslabených skupin pacientů a jak dlouhou a kvalitní ochranu proti COVID-19 poskytne, nyní ještě spolehlivě nevíme. V přednášce budou zhodnoceny literární údaje týkající se očkování hematologických pacientů a dárců krve či krvetvorné tkáně a aktuální odborná doporučení s důrazem na aspekty postvakcinační imunity proti viru

SARS-CoV-2 a řešení specifických situací.

#### Literatura

1. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383:2603–2615
2. Passamonti F et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 severity in patients with haematological malignancies in Italy: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Haematol.* 2020;7:e737–e745.
3. Mounzer A et al. Suboptimal response to COVID-19 mRNA vaccines in hematologic malignancies patients. *MedRxiv.* 2021;2021.04.06.
4. Algassim AA, Elghazaly AA, Alnahdi AS, et al. Prognostic significance of hemoglobin level and autoimmune hemolytic anemia in SARS-CoV-2 infection. *Ann Hematol.* 2021;100:37–43.
5. Cheuk DK, Chiang AK, Lee TL, Chan GC, Ha SY. Vaccines for prophylaxis of viral infections in patients with hematological malignancies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;3.
6. Libster R et al. Early high-titer plasma therapy to prevent severe Covid-19 in older adults. *N Eng J Med* 2021;384:610–618.

# Hemaferéza – aktuální postupy v urgentní a chronické terapii nemocných

Gašová Z., Bhuiyanová Ludvíková Z., Vacková B., Böhmová M., Slouková M.

Aferetické oddělení ÚHKT, 1. LF UK a VFN v Praze

## TERAPEUTICKÉ HEMAFERÉZY – TERAPEUTICKÉ ELIMINAČNÍ TECHNIKY VYUŽÍVAJÍCÍ CENTRIFUGAČNÍ PRINCIP

Terapeutické hemaferézy jsou léčebné extrakorporální výkony, jejichž cílem je zredukovat obsah patogeneticky aktivních komponent nebo zmnožených krevních složek v cirkulaci nemocného. Odebrané složky se nahrazují roztoky krystaloidů, koloidů, plazmou nebo erytrocyty od zdravých dárců. K terapeutickým výkonům se také obvykle přiřazují „produkční“ aferézy, při kterých se připravují koncentráty lidských tkání a buněk pro transplantaci a hemopoetickou rekonstituci nebo koncentráty mononukleárních buněk (MNC) pro protinádorovou terapii (DCVAC, CAR-T apod.). Terapeutické hemaferézy se provádějí pomocí separátorů krevních komponent, které využívají centrifugační princip. Krevní složky se separují podle své specifické hmotnosti. V průběhu výkonu se nemocnému nejprve odebírá krev, která se mísí s anti-koagulačním roztokem a poté vstupuje do přístroje, v němž dochází k oddělení a k sběru separované komponenty. Zbývající složky krve se vrací zpět do cirkulace nemocného.

Do skupiny terapeutických aferetických technik lze také přiřadit techniky založené nejen na centrifugačním principu, ale také techniky, které využívají filtrační nebo adsorpční postupy. V některých indikacích se jeden výkon provádí za pomoci dvou přístrojů, které pracují na rozdílných principech, např. na kombinaci centrifugace a imunoadsorpcie IgG. Provedení terapeutických hemaferéz obvykle zajišťují specializo-

vaná transfuzní, hematologická a nefrologická pracoviště.

Terapeutické hemaferézy lze rozdělit na několik následujících skupin:

- a) **Depleční výkony**, u nichž se z cirkulace nemocných odstraňují zmnožené složky krve – leukocyty, erytrocyty a trombocyty. Objem odebrané složky obvykle nepřevyšuje 1 000 ml. Odebraný objem lze dle potřeby nahradit vhodnými roztoky – krystaloidů nebo koloidních roztoků.
- b) **Výměnné výkony s výměnou plazmy nebo s výměnou erytrocytů**. V průběhu výkonů se odebírají velké objemy plazmy (1–1,5násobky plazmového objemu) nebo velké objemy erytrocytů (1–2násobky celkového objemu erytrocytů). Odebraný objem je nutné nahradit vhodnými náhradními roztoky – plazmou, koloidními roztoky nebo erytrocyty od zdravých dárců.
- c) **Imunoadsorpci postupy a extrakorporální hemorheoferéza**. V současné době se vyvíjejí stále účinnější separační techniky. Jejich využití je vhodné v situacích, kdy se centrifugační výměnou plazmaferézou nedaří snížit obsah nežádoucích komponent v cirkulaci. Jednou z dalších možností jsou imunoadsorpci postupy. Lze je využít semiselektivně k snížení obsahu určitého typu patogeneticky aktivní komponenty v plazmě, např. imunoglobulinů a lipoproteinů. Mezi látky s účinnou adsorpční schopností patří např. rekombinantní stafylokokový protein A, Peptid-GAM nebo ovčí protilátky proti lidským imunoglobulinům.

Další možnost představuje léčebný postup extrakorporální hemorheoferéza s eliminací definovaného spek-

tra látek s vysokou molekulární hmotností z cirkulace nemocného, např. fibrinogenu,  $\alpha$ -2-makroglobulinu, imunoglobulinu M (IgM), trombotulinu a LDL lipoproteinů. Tyto látky mají význam v patogenezi mikrocirkulačních onemocnění. U nemocných s věkem podmíněnou makulární degenerací (VMPD) pomáhá hemorheoferéza upravit reologické parametry krve, tj. viskozitu krve a plazmy, stejně jako agregabilitu erytrocytů a trombocytů a také poruchy průtoku krve v choroidu. Dále napomáhá upravit flexibilitu erytrocytů, oxygenaci tkání a vizuální funkce.

- d) Postupy, při nichž se separují přípravky pro transplantaci a hemopoetickou rekonstituci – PBPC/PBSC (peripheral blood progenitor cells / peripheral stem and progenitor cells – kmenové krvetvorné buňky z periferní krve).
- e) Postupy, při nichž se separují **mononukleární buněčné frakce** pro léčebné využití. Připravují se:
  - autologní koncentráty mononukleárních buněk pro extrakorporální fotochemoterapii (ECP), pro přípravu protinádorových vakcín na bázi dendritických buněk nebo pro přípravu CAR-T lymfocytů.
  - alogenní přípravky mononukleárních buněk pro DLI k potlačení relapsu leukémie u nemocných po transplantaci krvetvorných buněk – Graft vs. Leukemia Effect.
- f) **Pediatrické hemaferézy** představují samostatnou skupinu mezi terapeutickými výkony, přestože se v pediatrii využívají stejné principy aferetických postupů a stejné přístroje jako u dospělých nemocných. Děti se však liší



svými fyzickými a psychickými možnostmi a tolerancí k aferetickým postupům. U dětských pacientů je proto třeba vyřešit problémy vzniklé v souvislosti s relativně větším extrakorporálním objemem separačních systémů. Zvláště důležitá je příprava vyhovujícího žilního přístupu, volba vhodného antikoagulačního režimu a monitorování vitálních funkcí během výkonu.

## INDIKACE TERAPEUTICKÝCH HEMAFERÉZ

Terapeutické hemaferézy jsou výkony, které s výjimkou extrakorporální fotochemoterapie nezasahují do patogeneze onemocnění. Jsou však schopné upravit klinický stav nemocného, zlepšit kvalitu jeho života a případně oddálit závažné komplikace základního onemocnění. Uplatňují se v léčbě hematologických, nefrologických, neurologických, oftalmologických, onkologických a revmatologických onemocnění. Extrakorporální fotochemoterapie (ECP, fotoferéza) je terapeutický postup, který ovlivňuje reaktivitu imunitního systému nemocného. Metoda se indikuje v terapii onemocnění, na jejichž patogenezi se podílejí T lymfocyty.

Terapeutické hemaferézy se indikují při akutních stavech, nejčastěji u nemocných se záchytem trombotické trombocytopenické purpury (TTP) a u nemocných s hyperleukocytózou s příznaky z leukostázy při zachytu AML. V těchto situacích je třeba výkon provést co nejdříve, protože má buď život zachraňující význam nebo předchází výraznému zhoršení klinického stavu.

K urgentním indikacím může docházet v pracovních hodinách, ale často také nečekaně v noci a během víkendů a svátků. Neodkladné výkony u kriticky nemocných představují neplánované situace, které vybočují z běžné rutinní práce. Urgentní výkony většinou představují jedinou možnost, jak účinně pomoci v klinicky složité situaci. Je třeba počítat také s riziky výkonů a s nežádoucími reakcemi, které mohou nastat zvláště u nemocných se sníženými fyzic-

kými rezervami. Velkou pomocí jsou zde zkušenosti a znalosti pracovníků aferetického týmu a možnost provádět výkon v indikovaných případech u lůžka nemocného v podmínkách oddělení JIP.

V terapii nemocných s chronickými onemocněními v situacích, kdy nehrozí nebezpečí z prodlení, se výkony předem plánují a provádějí se v domluvených termínech, často opakovaně u stejného nemocného (extrakorporální fotochemoterapie u nemocných s kožními lymfomy nebo u nemocných s akutní a chronickou reakcí štěpu proti hostiteli (GVHD), extrakorporální imunoadsorpcí u nemocných s onemocněním Myasthenia gravis, depleční erythrocytaferéza u nemocných s polycytemia vera nebo extrakorporální hemorheoferéza u nemocných s věkem podmíněnou makulární degenerací, VPMD).

V akutních i plánovaných situacích je třeba počítat se zajištěním některých postupů

a) **Funkční žilní přístup „Conditio sine qua non“.** Volba vhodného žilního přístupu vychází z naléhavosti výkonů, z klinického stavu nemocného, z možností pracoviště, z předpokládané doby trvání a frekvence výkonů a také ze schopnosti nemocného spolupracovat. Pracovníci odpovídající za provedení aferézy (lékař, sestra) mají předem posoudit žilní vstup nemocných. Pokud je funkční periferní žilní přístup, doporučuje se jej upřednostnit před centrálním žilním vstupem. Centrální žilní katetr je vhodnou alternativou, přestože je provázený vyšším rizikem komplikací, např. pneumothorax, hemothorax, hematoma, vzduchová embolie a infekční komplikace. Nejčastěji se používají centrální žilní vstupy nebo av. shunt. U dlouhodobé a opakované terapie není periferní žilní vstup vhodný.

b) **Cíle terapie.** Před zahájením série terapeutických výkonů se doporučuje stanovit cíle terapie a vhodný separační postup (rozsah a frekvence výkonů, volba náhradních roztoků, antikoagulace). Terapeutickým cílem

je „nasbírání“ předpokládané dávky krevních komponent, dosažení předem stanovené koncentrace leukocytů, trombocytů a erytrocytů v krvi nemocného nebo významné snížení hladiny patogeneticky aktivních komponent (protilátek, lipoproteinů a pod) v plazmě nemocného. Efekt terapie u deplečních, u výměnných výkonů a u produkčních aferéz se obvykle očekává po 1–7 výkonech. U extrakorporální fotochemoterapie je situace odlišná, terapie ovlivňuje reaktivitu imunitního systému a je relativně dlouhodobá. Účinnost závisí na terapeutickém postupu a obvykle se posuzuje po cca 3–12 měsících léčby. Série terapeutických výkonů se ukončí po dosažení plánovaného cíle nebo se ukončí v situaci, kdy cíle nelze dosáhnout a potenciální rizika převyšují efekt terapie.

c) **Monitorování parametrů koagulace.** V průběhu výměnné plazmaferézy (TPE) se odstraní jak patogeneticky aktivní komponenty obsažené v plazmě, tak i řada dalších látek, včetně koagulačních faktorů, které se podílejí na zajištění hemostázy. Výměna 1,0–1,5 objemu plazmy odstraní přibližně 63–75 % proteinů, včetně koagulačních faktorů. Pro zajištění normální funkce hemostázy postačí cca 15–20 % jejich aktivity. Hodnoty koagulačních faktorů se obnoví v průběhu 2–3 dnů po TPE.

U TPE se jako náhrada odebrané plazmy používá buď plazma nebo koloidní roztoky, např. 5% roztok albuminu. V terapii nemocných s TTP a HUS se podává plazma. Plazmu lze také doporučit jako náhradu v situacích, kdy při opakovaných výkonech dochází k výrazné redukci hladin fibrinogenu a koagulačních faktorů. Pokud se TPE provádějí opakovaně v denním režimu za použití náhrady koloidním roztokem, může nastat výrazné snížení hladin koagulačních faktorů. Sledování parametrů koagulace je vhodné, každodenní monitorování všech ukazatelů obvykle není

nutné. V situacích, kdy se nepředpokládají významné změny koagulačních parametrů, lze sledovat hladinu fibrinogenu jako nepřímého ukazatele deplece také ostatních koagulačních faktorů.

## ÚČINNOST TERAPEUTICKÝCH HEMAFERÉZ

Předpokladem pro účinné provedení terapeutických hemaferéz je: (a) přítomnost patogeneticky aktivní komponenty v cirkulaci nemocného, (b) použití vhodné techniky, která umožní účinné odstranění této komponenty a (c) možnost ověření výsledků terapie.

U deplečních výkonů závisí množství odebrané krevní komponenty na objemu zpracované krve, i když se zde na účinnosti výkonů podílejí další ukazatele jako koncentrace separovaných komponent v sběrné linii, rychlost sběru a také doba výkonu. U deplece trombocytů (24 nemocných ÚHKT s onemocněním polycytemia vera, 68 výkonů) se zpracováním 1–1,8 objemu krve nemocných jsme pozorovali v průměru 50% pokles koncentrace trombocytů v krvi. U deplece leukocytů u nemocných s AML (33 nemocných, 74 výkonů) nastal pokles leukocytů cca o 40 %, zatímco u nemocných s CML (32 nemocných, 126 výkonů) byla účinnost v našem sledovaném souboru nižší s poklesem leukocytů cca o 30 %. U terapeutické leukocytaferézy se relativně často prokáže menší pokles počtu leukocytů po výkonu, než by se dalo očekávat. Uvedený jev pravděpodobně souvisí s procesem mobilizace leukocytů z extramedulárního do intravaskulárního prostoru, ke kterému dochází v průběhu výkonu. Rozsah této mobilizace nelze předem odhadnout.

U depleční erythrocytaferézy lze snížit hodnoty hematokritu nemocných v průběhu jednoho výkonu o cca 6–10 %, ev. i více, v závislosti na klinickém stavu a toleranci nemocného. U výměnné erythrocytaferézy u nemocných se srpkovitou anémií jsme pozorovali pokles hodnot hemoglobinu S (HbS) z 92 % před vý-

konem na požadovaných cca 30 % po výkonu.

U TPE (výměnné plazmaferézy) závisí rozsah a frekvence provádění výkonů na objemu plazmy nemocného, na distribuci patogeneticky aktivní komponenty mezi intravaskulárním a extravaskulárním prostorem a na rychlosti syntézy této komponenty. Účinnost odstranění látek během TPE lze vyjádřit exponenciální funkcí. Z průběhu závislosti vyplývá, že neúčinnějším postupem je výměna plazmy v rozsahu 1–1,5násobku celkového objemu plazmy nemocného. V průběhu výkonu se odstraní 2/3 z celkového množství intravaskulární patogeneticky aktivní komponenty. Dalším zvyšováním rozsahu výkonu se již odstraní jen malé množství patogeneticky aktivní komponenty, avšak zvyšuje se frekvence nežádoucích reakcí nemocného. V souboru našich nemocných jsme pozorovali pokles hladiny fibrinogenu po TPE o cca 60 %, zatímco hladiny IgG se snížily cca o 30 %.

U extrakorporální imunoabsorpce IgG (Peptid-GAM) se snížila při ošetření jednoho objemu plazmy hladina fibrinogenu o 15 % a hladina IgG o 65 %.

U extrakorporální rheoferézy jsme v našem souboru 24 nemocných s VPMD (s věkem podmíněnou makulární degenerací) při ošetření jednoho objemu plazmy pozorovali v průměru pokles cholesterolu o 40 %, triglyceridů o 50 %, LDL o 57 %, fibrinogenu o 55 % a  $\alpha$ -2 makroglobulinu o 70 %.

U autologních separací PBSC/PBPC (80 nemocných z VFN s maligními lymfomy, 109 výkonů) jsme získali z jedné separace průměrnou dávku  $7,5 \times 10^6$  CD 34+ buněk/kg hmotnosti nemocného. U alogenních separací PBSC/PBPC (62 dárců ÚHKT, 76 výkonů) jsme z jedné separace připravili v průměru dávku  $6,3 \times 10^6$  CD 34+ buněk/kg hmotnosti nemocného. Doporučená dávka k transplantaci se pohybuje v rozmezí  $2-5 \times 10^6$  CD 34+ buněk/kg hmotnosti nemocného. Objem zpracované krve odpovídal rozmezí od 2–5násobkům celkového objemu krve nemocného nebo dárce.

## BEZPEČNOST TERAPEUTICKÝCH HEMAFERÉZ

Přestože se terapeutické hemaferézy považují za bezpečné výkony, mohou v jejich průběhu nastat závažnější nežádoucí reakce. Během separací dochází k přesunům tekutin mezi intravaskulárním a extravaskulárním prostorem, k změnám v hladinách minerálů v séru, k změnám hladin koagulačních faktorů a imunoglobulinů.

Ve zvýšeném riziku nežádoucích reakcí se nacházejí nemocní:

- s poruchami kardiorepiračního systému s nestabilními vitálními funkcemi,
- v intenzivní péči,
- s anémií a s trombocytopenií,
- s krvácivými komplikacemi,
- léčení ACE inhibitory,
- s alergií,
- s potransfuzními reakcemi v anamnéze a
- gravidní nemocné.

Nemocní mohou být v bezvědomí (např. u TTP), na terapii kyslíkem nebo na ventilační podpoře. Mohou mít známky orgánového selhávání. V takových situacích je nutné zajistit pokračování podpory vitálních funkcí a další intenzivní péči i v průběhu výkonu.

Během náročnějších výkonů, např. u velkoobjemových separací PBSC/PBPC, mohou nastat významné změny v hladinách minerálů v séru (pokles hladin  $K^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ) a také může dojít k výraznému ovlivnění parametrů koagulace a krevního obrazu. Alkalóza potencuje vliv hypokalémie a obdobně působí podání glukózy a inzulínu.

V průběhu výměnných terapeutických výkonů se pacientům podávají transfuze, které mohou být provázené potransfuzními reakcemi. Při výměnné plazmaferéze v terapii TTP a HUS se opakovaně transfundují velké objemy plazmy.

Koncentráty erythrocytů se podávají ve velkém množství a opakovaně při provádění výměnné erythrocytaferézy u nemocných s malárií nebo se srpkovi-

tou anémií. Erytrocyty se též používají k předplnění přístroje při provádění terapeutické hemaferézy u dětí. Je vhodné, aby koncentráty erytrocytů nebyly starší 7 dnů. U relativně „čerstvých“ erytrocytů je nižší riziko hemolýzy a erytrocyty obsahují vysoké hladiny 2,3 DPG (nižší afinita Hb k O<sub>2</sub> a snadnější uvolnění O<sub>2</sub> v tkáních). V supernatantu čerstvých erytrocytů jsou nízké hladiny K<sup>+</sup> a kyseliny mléčné. Postupy při aplikaci transfuzních přípravků v průběhu terapeutických hemaferéz se shodují se standardními postupy při podávání transfuzí.

U plánovaných výkonů je vhodné předem zajistit dostatečnou přípravu nemocného – ověřit, ev. připravit vyhovující žilní přístup, zajistit minimální hodnoty krevního obrazu (hematokrit minimálně 21 % – vhodněji alespoň 24 %, trombocyty vyšší než 50×10<sup>9</sup>/l), ověřit stav kardiopulmonálního systému, renálních a hepatálních funkcí, mineralogram a parametry koagulačních vyšetření – APTT a Quick, hladina fibrinogenu.

Není vhodné, aby byl nemocný v průběhu výkonů na souběžné terapii ACE inhibitory pro zvýšené riziko závažných hypotenzivně – anafylaktoidních reakcí. V průběhu výkonů se doporučuje u pacientů neinvazivní monitorování vitálních funkcí. Pacienti, případně dárce, jsou pod stálým dohledem sestry a lékaře.

Nežádoucí reakce se obvykle vyskytují v rozmezí od 3 % do 25 % výkonů. Většina komplikací souvisí s nedostatečnou funkcí žilního přístupu nebo s klinicky nestabilním stavem pacienta. Vlastní separační proces vyvolává nežádoucí reakce v menším počtu případů, cca v 1 % až v 11 % výkonů. Reakce jsou většinou méně závažné a lze je úspěšně vyřešit i bez předčasného ukončení výkonu, např. hypokalcemie nebo lehčí hypotenzní reakce pacienta. Nicméně byly popsány i smrtelné komplikace – v důsledku krvácení, kardiopulmonálního selhání, syndromu TRALI nebo v souvislosti se vznikem těžké hypotenzivně-anafylaktoidní reakce u nemocných léčených ACE inhibitory.

S ohledem na možné komplikace v průběhu hemaferéz se terapeutické výkony mají indikovat na základě posouzení očekávaného přínosu terapie a jeho porovnání s možnými riziky. ASFA (Americká společnost pro aferézu) publikuje a pravidelně reviduje doporučené postupy pro provádění terapeutických hemaferéz u jednotlivých onemocnění. Využívá poznatků medicíny založené na důkazech. Doporučení se týkají indikací, rozsahu a ukončení terapeutických hemaferéz. Aferetická pracoviště v České republice respektují doporučení ASFA a pracují podle jejich postupů.

### Literatura

1. Bruce C. McLeod „Apheresis Principles and Practices“, AABB Press, Bethesda, Maryland 2003.
2. Balogun, R. A., Therapeutic Apheresis in Special Population, J. of Clin. Apher. 2010;25: 265–274.
3. Connelly-Smith L, Tanhehco YC, Chhibber V, et al., Choosing Wisely for Apheresis, J. of Clin. Apher. 2018;33(5):576–579.
4. Gašová Z, Terapeutická výměnná plazmaferéza, Postgraduální medicína, 2012;14(8): 877– 884.

## Význam výměnné plazmaferézy v léčbě trombotických mikroangiopatií

Lánská M., Bláha M., Žák P.

IV. interní hematologická klinika FN Hradec Králové

Trombotické mikroangiopatie (TMA) představují skupinu heterogenních onemocnění, která jsou charakterizovaná poškozením endotelu drobných cév v různých orgánech. Podstatou je tvorba trombocytárních agregátů v mikrocirkulaci s následnou poruchou funkce poškozených orgánů, zejména ledvin, CNS a srdce. Dochází ke konzumpci trombocytů a rozvoji mikroangiopatické hemolytické anémie (MAHA) [1]. TMA zahrnují velmi nesourodou skupinu syndromů a stavů, kde ke konečné diagnóze do-

chážíme postupným vylučováním jednotlivých příčin (per exclusionem).

Původně byla TMA dělena do 2 skupin – trombotická trombocytopenická purpura (TTP) a hemolyticko-uremický syndrom (HUS), přičemž první se dělila dále na „idiopatickou“ a „sekundární“ a druhá na „typický“ a „atypický“ HUS [3]. Tato běžně používaná terminologie však nedokáže rozpoznat složitost TMA a nerozlišuje také mezi různými patologickými mechanismy.

Při podezření na TMA je nutno na prvním místě vyloučit TTP. Onemocnění je

výsledkem vrozeného nebo získaného deficitu ADAMTS13 (disintegrin metaloproteáza typ I, člen 13), metaloproteázy štěpící velké multimery von Willebrandova faktoru na menší multimery. První případ byl popsán v roce 1924, ale mnoho let byla prognóza pacientů fatální (90% úmrtnost), dokud použití výměnné transfuze nebo infuze plazmy nevedlo ke zlepšení přežití. Randomizovaná kontrolovaná studie Rockové prokázala vyšší účinnost terapeutické výměny plazmy (therapeutic plasma ex-

change – TPE) proti infuzi plazmy [2]. TPE je podle americké společnosti ASFA (American Society for Apheresis) definována jako terapeutický postup, při kterém krev pacienta prochází zařízením (separátorem), které odděluje plazmu od ostatních složek krve. Odebraná plazma se nahradí náhradním roztokem (albuminem nebo plazmou) [4].

TPE se stala standardem péče o pacienty s TTP. Efektivita léčby byla prokázána před pochopením patogeneze TTP nebo jiných TMA, proto byla TPE následně aplikována na všechny TMA na základě zlepšeného přežití pacientů s TTP. S obrazem TMA se můžeme setkat u mnoha dalších onemocnění, jako jsou maligní hypertenze, diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) či preeklampsie, u kterých ale nebyl efekt TPE prokázán [3].

Bylo popsáno několik mechanismů účinku TPE při léčbě TTP. Mezi popsané mechanismy patří odstranění patologických protilátek, imunitních komplexů a cirkulujících cytokinů, a nahrazení chybějících složek plazmy. Někdy jsou také popisované změny ve funkci imunitního systému (vč. změn ve funkci T a B buněk), tyto mechanismy by mohly hrát roli v efektivitě TPE u jiných typů TMA. Bohužel chybí randomizované kontrolované studie poskytující jasné důkazy o účinnosti. Většinou jsou k dispozici pouze kauzistiky a série případů.

Každé 3 roky publikuje ASFA doporučení pro jednotlivé aferetické metody. V tabulce 1 je uveden souhrn jednotlivých TMA a současný pohled na možnosti využití TPE v léčbě. Efekt byl prokázán pouze u TTP, kde zůstává TPE metodou volby, u ostatních typů je význam většinou sporný [4]. V roce 2016 byly publikovány výsledky studie Li et al., která nezjistila žádný přínos TPE u pacientů s TMA, kde aktivita ADAMTS13 byla vyšší než 10 % [5].

Pro správnou léčbu a včasné zahájení specifické terapie je nezbytná rychlá diferenciální diagnostika všech příčin TMA. Při podezření na TTP je nutné co nejdříve zahájit léčbu pomocí TPE. Charakteristika procedury je v Tabulce 2.

**Tab. 1. Indikace TPE v léčbě TMA (modifikováno podle Padmanabhana [5]).**

Onemocnění	Indikace	Úloha TPE podle ASFA	Síla důkazů (EBM)
TTP		I	1A
TMA asociovaná s infekcí (STEC-HUS)		III	2C
TMA zprostředkovaná komplementem (aHUS)	protilátky proti H faktoru mutace genů MCP	I III	2C 2C
TMA asociovaná s transplantací krvevorných buněk		III	2C
TMA asociovaná s léky	Ticlopidin Clopidogrel Gemcitabine/Quinine	I III IV	2B 2B 2C
HELLP syndrom	před porodem po porodu	IV III	2C 2C
TMA koagulační zprostředkovaná	Mutace THBD, DGKE, PLG	III	2C

Kategorie I – léčba 1. linie, II – léčba 2. linie, III – optimální role aferézy nebyla stanovena, IV – aferéza se zdá být neefektivní

**Tab. 2. Charakteristika TPE procedury dle doporučení ASFA (modifikováno podle Padmanabhana, [5]).**

Frekvence: denně

Doba trvání: do vymizení neurologických obtíží, normalizace LDH, vzestupu trombocytů nad  $150 \times 10^9/l$  po dobu 2 dnů, lze ukončit ihned nebo postupně

Vyměněný objem plazmy: 1–1,5násobek plazmatického objemu

Náhradní tekutina – čerstvě zmrazená plazma, v případě alergických reakcí solvent detergentní plazma

Další postup závisí na časném vyšetření deficitu ADAMTS13. V případě aktivity enzymu pod 10 % se jedná o TTP a bude pokračováno v léčbě pomocí TPE v kombinaci s kortikoidy [6]. Při hodnotě nad 10 % nutno vyloučit jiné příčiny TMA, při postižení ledvin zejména HUS zprostředkovaný komplementem (CM-HUS, atypický HUS).

V posledních letech se do popředí léčby některých typů TMA dostávají monoklonální protilátky. Kaplacizumab, humanizovaná bivalentní nanočástice zacílená na A1 doménu von Willebrandova faktoru (vWF) působí blokádu vazby trombocytů na extra-velké multimery vWF, tím zabraňuje tvorbě mikrotrombů. Indikace podání kaplacizumabu u TTP byla podpořena studiemi TITAN a HERCULES. Dle nejnovějších doporučení

je kaplacizumab používán již v 1. linii léčby [6].

Dalším onemocněním, kde lze s úspěchem použít monoklonální protilátky, je CM-HUS. Eculizumab, rekombinantní humanizovaná protilátka proti C5 komplementu způsobuje blokádu terminální složky kaskády komplementu.

## ZÁVĚR

Trombotické mikroangiopatie zůstávají i dnes závažnými onemocněními spojenými s vysokou morbiditou a mortalitou. Největším přínosem v diagnostice i terapii je rychlé stanovení aktivity enzymu ADAMTS13, což umožní odlišení TTP od ostatních TMA. U získané formy TTP zůstává výměnná plazmaferéza (TPE) život zachraňujícím výkonem. U jiných typů TMA je využití TPE omezené. Chybí do-

statečné důkazy o účinnosti této terapie. Léčba těchto jednotek spočívá v léčbě vyvolávající příčiny a podpůrná terapie. Důležitou roli v moderní léčbě TMA se hrávají i monoklonální protilátky.

### Literatura

1. Novotný J, Penka M, Trombotické mikroangiopatie, *Transfuze Hematol Dnes*. 2020;26(2): 80–90.
2. Rock et al., Comparison of Plasma Exchange with Plasma Infusion in the Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, *August 8, 1991 N Engl J Med* 1991; 325:393–397
3. Winters JL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1):632–638. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.632.
4. Padmanabhan A et al., Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice – Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apher-

resis: The Eighth Special Issue. *J Clin Apher*. 2019;34(3):171–354.

5. Li A, Makar RS, Hurwitz S, et al. Treatment with or without plasma exchange for patients with acquired thrombotic microangiopathy not associated with severe ADAMTS13 deficiency: a propensity score matched study. *Transfusion*. 2016;56(8):2069–2077

6. Zheng XL et al. ISTH guidelines for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2020;18(10):2496–2502.

## Je darování krvetvorných buněk bezpečné?

Bhuiyanová Ludvíková Z., Gašová Z., Böhmová M., Slouková M., Pecherková P.

*Aferetické oddělení, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

Periferní krvetvorné buňky (PBPC) se používají k alogenním transplantacím krvetvorných buněk mnoho let. Poprvé byly použity již v roce 1978. Získávají se od rodinných a nerodinných dárců aferézou po mobilizaci pomocí růstového faktoru G-CSF. Cílem aferézy je efektivně nasbírat požadovanou transplantační dávku s ohledem na bezpečnost dárce. Od počátků darování krvetvorných buněk byla považována bezpečnost dárců po mobilizaci a odběru za důležitou součást celého procesu darování. Avšak se založením The World Marrow Donor Association (WMDA) v roce 1994 se této oblasti začala věnovat ještě větší pozornost. WMDA spolu s dalšími odbornými organizacemi, jako je např. EBMT (The European Society for Blood and Marrow Transplantation), vytváří a doporučuje standardy týkající se péče o nerodinné dárce. O rodinné dárce se v minulosti starala převážně Transplantační centra. V posledních letech však dochází v souvislosti s nutností dalšího vylepšování bezpečnosti a kvality péče o pacienty i dárce k akreditačním šetřením, která nás nutí přehodnocovat a vylepšovat dlouho zavedené postupy. V souvislosti se zavedením haploidentických transplantací dochází také k výraznému nárůstu počtu odběrů krvetvorných buněk u rodinných dárců a ke

změnám v posuzování jejich způsobilosti k odběru. V praxi se rozvíjí nové separační techniky, používají se modernější přístroje a zavádějí se nové přípravky k mobilizaci dárců. Začíná spíše převažovat názor, že standardy péče o rodinné dárce by měly být stejné jako péče o nerodinné dárce. Těmito aspekty se opakovaně v posledních letech zabývaly pracovní skupiny EBMT a WMDA a byla provedena řada studií, které se týkaly bezpečnosti darování krvetvorných buněk. Případné nežádoucí účinky spojené s darováním krvetvorných buněk se hlásí do společné databáze WMDA, aby se mohla data vždy zpětně vyhodnotit.

Na našem oddělení odebíráme PBPC od 90. let 20. století. Rodinné a nerodinné dárce po mobilizaci a separaci krvetvorných buněk od roku 2002 dlouhodobě sledujeme. Rodinní dárce jsou k aferéze indikováni z klinického úseku ÚHKT a od roku 1996 spolupracujeme s Českým registrem dárců krvetvorných buněk v Praze v odběrech krvetvorných buněk od nerodinných dárců. V minulosti byl dlouho k mobilizaci všech dárců používán pouze originální přípravek filgrastim. První použití biosimilárního filgrastimu Zarzia u rodinných dárců v ÚHKT je datováno k lednu 2017, u nerodinných dárců byl použit až o rok později, v lednu

2018. Haploidentické transplantace se začaly v na Klinickém úseku ÚHKT provádět v roce 2014 a my jsme v souvislosti s jejich zavedením pozorovali výrazný nárůst počtu odběrů krvetvorných buněk a trend ke změně v posuzování způsobilosti u rodinných dárců. V roce 2018 získalo ÚHKT akreditaci JACIE, čemuž předcházelo přehodnocování a vylepšování již zavedených procesů. Velký důraz je stále kladen na všechny preventivní kroky při odběru s cílem minimalizovat množství možných nežádoucích událostí. Pokud by nastala sporná situace ohledně zdravotní způsobilosti dárce, musí se velmi podrobně zhodnotit možná rizika pro dárce a benefity pro příjemce. Je nutné, aby celou situaci zhodnotily týmy nezávislých odborníků z medicínského i etického hlediska. Zdravotní způsobilost k odběru má posuzovat lékař, který neohrožuje příjemce krvetvorných buněk. Při dlouhodobém sledování dárců jsme až na ojedinělé případy nezaznamenaly závažnější změny zdravotního stavu dárců v souvislosti s mobilizací a odběrem periferních krvetvorných buněk. Naše dlouholeté zkušenosti potvrzují, že darování krvetvorných buněk z aferézy je bezpečné. Při mobilizaci a odběru se vyskytuje nevelké množství nezávažných komplikací, které je schopný vyřešit zkušený

tým aferetického oddělení. Celému procesu darování krvevorných buněk ale hlavně musí předcházet odborný a uváž-

livý výběr dárce a jeho dostatečná informovanost o celém postupu darování. Nadále je nezbytné u nerodinných i ro-

dinných dárců krvevorných buněk pokračovat ve sledování jejich dlouhodobého zdravotního stavu.

## Role lékaře aferetického centra při léčebných výkonech v nehematologických indikacích

Blahutová Š.<sup>1,2</sup>, Hrdličková R.<sup>1</sup>, Čermáková Z.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Krevní centrum, FN Ostrava

<sup>2</sup> LF OU

**Úvod:** Lékař aferetického centra zastřešující léčebné hemaferetické metody multiborově spolupracuje, a to nejen s hematologem, ale i s neurologem, nefrologem, internistou, onkologem, gynekologem, oftalmologem a s lékaři jiných medicínských oborů. Je od něj vyžadována komplexní znalost principů metod hemaferéz, legislativy a odborné zkušenosti. Řídí se při svých rozhodnutích aktuálními doporučeními pro provádění aferetických metod – v souladu s ASFA (*American Society for Apheresis*) a ESFH (*European Society for Hemapheresis*). Je v jeho kompetenci vést a pravidelně aktualizovat standardní operační postupy a dokumentaci ke všem hemaferetickým výkonům tak, aby vyhovovaly správné klinické praxi, legislativě, potřebám provádějícího zdravotnického pracoviště a požadavkům různých auditorských subjektů a zadavatelů. Je zodpovědný za pravidelná školení a edukaci personálu aferetického pracoviště a spolupracujících lékařů. Společně s technikem dohlíží na přístrojové vybavení a jejich validace. Ve spolupráci s ošetřujícím lékařem pacienta se podílí na správné indikaci hemaferetického výkonu. Má právo případně výkon i zkontraindikovat. Určuje druh separačního přístroje a příslušenství (sety, filtry, kolony). Vybírá druh a množství substitučních a antikoagulačních roztoků pro jednotlivé výkony. Volí ve spolupráci s aferetickou sestrou nejoptimálnější žilní přístup. Edukuje pacienta před výkonem, sepisuje s ním informovaný sou-

hlas. Stanovuje přípravu pacienta tak, aby výkon zvládl s co nejmenšími obtížemi. Je na jeho rozhodnutí, zda bude výkon proveden v ambulantním režimu, či za hospitalizace. Navrhuje rozsah, počet a frekvenci výkonů. Přímo nastavuje a zapisuje do dokumentace aferetického centra zamýšlené parametry hemaferetických procedur, rozhoduje o nutnosti a druhu podání premedikace a o míře a druhu antikoagulace extrakorporálně zpracovávané krve během výkonu. Stanovuje způsob monitoringu pacienta, laboratorní odběry a konkomitantní léčbu. Má nezastupitelnou roli z hlediska bezpečnosti výkonu, tzn. musí být kdykoli připraven řešit ve spolupráci s aferetickou sestrou případné nežádoucí reakce při a po výkonu. Je zodpovědný za zhodnocení bezprostředního léčebného efektu a všech výsledků. Sepisuje lékařskou zprávu pro ošetřujícího lékaře. Dle klinického stavu pacienta po výkonu rozhoduje o jeho observaci, dimisi či přijetí/pokračování hospitalizace. Optimalizuje harmonogram hemaferetických výkonů, tzn. v indikovaných případech upozorňuje ošetřujícího lékaře na nutnost změny počtu, frekvence výkonu, či dokonce změnu léčebné strategie. Pravidelně statisticky vyhodnocuje počty a efektivitu výkonů na aferetickém pracovišti, analyzuje výskyt nežádoucích reakcí a navrhuje/realizuje nápravná opatření.

**Metodika:** Rozbor specifik u vybraných hemaferetických metod dle literárních zdrojů a jejich porovnání s mnohaletými

vlastními zkušenostmi aferetického úseku ambulance Krevního centra Fakultní nemocnice Ostrava.

**Výsledky:** Na aferetickém úseku ambulance Krevního centra Fakultní nemocnice Ostrava je ročně prováděno cca 670 výměnných léčebných aferéz (TPE), 120 imunoadsorpcí (IA), 40 reoferéz (REO), 75 deplečních erythrocytaferéz (EA) a 40 leukaferetických separací mononukleárních buněk od nestimulovaných dárců (LA). U výkonů TPE dominují neurologické diagnózy jako je myastenia gravis, sclerosis multiplex, akutní a chronické zánětlivé demyelinizační polyneuropatie (AIDP a CIDP). U výkonů EA je prováděna redukce erythrocytů pro diagnózy polycytemia vera, sekundární polyglobulie a hereditární hemochromatóza. U výkonů IA je prováděna deplece imunoglobulinů při autoimunitních chorobách typu myastenia gravis a fokální segmentální glomerulosclerosis. Reoferézy byly indikovány pro suchou formu věkem podmíněné makulární degenerace sítnice (VPM). U každé metody jsou zdůrazněny indikační a terapeutické limity, úskalí výkonů a možné komplikace. Sdělení obsahuje poučné kazuistiky.

**Závěr:** Bezpečné a efektivní provedení hemaferéz je dáno souborem faktorů, mezi něž patří především správná indikace a načasování výkonu, přístrojové vybavení a náhradní roztoky, zajištění vhodného žilního přístupu, adekvátní edukace a příprava pacienta a erudice lékařského i sesterského personálu.

# Imunohematologie trombocytů

Bolcková H. T.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

## TROMBOCYTOVÉ ANTIGENY

Trombocyty mají na svém povrchu HPA antigeny (human platelet antigens – antigeny lidských trombocytů), ty se nacházejí na glykoproteinových komplexech IIb/IIIa, Ib/IX/V, Ia/IIa a proteinu CD109.

V současné době je popsáno 35 HPA antigenů, 12 HPA antigenů tvoří 6 bíle-lických systémů (HPA 1,2,3,4,5,15) s antigeny „a“ a „b“. Alely pro tyto antigeny se liší v jednom nukleotidu genu kódujícího příslušný membránový glykoprotein ev. protein. Antigen „a“ je produktem alely s vyšší frekvencí výskytu, antigen „b“ je produktem alely s nižší frekvencí výskytu. Ostatní HPA antigeny jsou vzácné antigeny s nízkou frekvencí výskytu, protilátky proti jejich protikladným (antitetickým) antigenům nebyly zjištěny.

Na povrchu trombocytů se nacházejí také glykoproteiny IV (CD36) a VI a také malé množství antigenů krevních skupin I, P a systému ABO (antigeny A, B, H). Antigeny A, B, H jsou navázány na cukerných strukturách připojených ke všem trombocytovým glykoproteinům. Na trombocytech jsou exprimovány také antigeny HLA I. třídy A, B a méně i C lokusu.

## ANTITROMBOCYTOVÉ PROTILÁTKY

Protilátky proti vlastním trombocytovým antigenům způsobují idiopatickou nebo autoimunní trombocytopenickou purpuru (AITP). Aloprotilátky proti trombocytovým antigenům mohou způsobit závažné klinické stavy: neonatální aloimunní trombocytopenii (NAITP), refrakternost na podání trombocytů (PTR), potransfuzní purpuru (PTP), pasivní aloimunní trombocytopenii (PAT), s transplantací asociovanou aloimunní trombocytopenii (TAT).

**Akutní idiopatická nebo autoimunní trombocytopenická purpura (AITP)** se vyskytuje zejména u dětí, obvykle po virové infekci s vyšší incidencí na podzim a v zimě. Antitrombocytové autoprotilátky u akutní AITP bývají častěji třídy IgM. **Chronická AITP** se vyskytuje většinou u dospělých. Auto-protilátky u chronické AITP bývají třídy IgG (95 %), IgM (26 %) a IgA (4 %). Auto-protilátky jsou obvykle vázány na trombocyty a jako volně cirkulující protilátky jsou detekovatelné v asi 40 % případů.

AITP během těhotenství může způsobit neonatální AITP autoprotilátkami třídy IgG, které jsou schopny projít přes placentu. Není zde žádný prediktivní faktor pro výskyt a závažnost fetální/neonatalní trombocytopenie způsobené mateřskými autoprotilátkami. Neexistuje žádná korelace mezi počtem trombocytů u matky a u dítěte. Nicméně závažnost trombocytopenie u prvního postiženého dítěte koreluje s trombocytopenií u dítěte v následující graviditě. Intrakraniální krvácení nastává velmi vzácně.

Antitrombocytové autoprotilátky nejsou antigen specifické a jsou namířené proti společnému epitopu jednoho nebo více glykoproteinů. Asi 25 % protilátek je glykoprotein specifických.

**Neonatální aloimunní trombocytopenie (NAITP)** se projevuje jako trombocytopenie a krvácení u jinak zdravého plodu/novorozence. Je způsobena mateřskou aloprotilátkou proti otcovským aloantigenům plodu/novorozence. Tato protilátka se váže na trombocyty plodu a může urychlit jejich destrukci, což vede k trombocytopenii. Trombocytopenie může být různě závažná od mírné po těžkou s krvácivými projevy, nejzávažnější formou je intrakraniálního krvácení, které může být i fatální. Nejčastější

příčinou v Kavkazské populaci je protilátka anti-HPA-1a – je to zároveň protilátka, která způsobuje nejzávažnější trombocytopenie s krvácivými projevy vč. intrakraniálního krvácení. Až v 80 % případů dochází ke krvácení už prenatálně, po porodu je největší riziko krvácení v prvních 96 h života.

## REFRAKTERNOST NA PODÁNÍ TROMBOCYTŮ (PTR)

Refrakternost na podání trombocytů je definována jako neočekávaně nízký vzestup počtu trombocytů u pacienta po transfuzi čerstvých ABO kompatibilních trombocytů. Většina případů refrakternosti je způsobena neimunními příčinami. Nicméně významná část pacientů (26–71 %) si na dlouhodobé transfuzní terapii vytvoří protilátky proti antigenům HLA I. třídy, které potom mohou být příčinou zrychlené destrukce transfundovaných trombocytů. Asi 10 % pacientů refrakterních na trombocyty si vytvoří vedle anti-HLA protilátek také aloprotilátky proti trombocytovým HPA antigenům. Byly popsány také případy refrakternosti způsobené aloprotilátkami anti-HPA a také anti-gpIV.

**Potransfuzní purpura (PTP)** je vzácná potransfuzní reakce charakterizovaná náhlým poklesem počtu trombocytů 5–10 dnů po transfuzi krve. Byla popsána po transfuzi plné krve, erytrocytů, trombocytů a plazmy. Postihuje již imunizované pacienty (zejména ženy po vícečetných graviditách), jedná se o sekundární imunitní odpověď.

V séru pacienta jsou přítomny specifické antitrombocytové aloprotilátky (nejčastěji anti-HPA-1a), v akutní fázi jsou přítomny také autoprotilátky. PTP se prezentuje těžkou trombocyto-

pení (< 10 000 trombocytů/μl), může být přítomno život ohrožující krvácení. V 10–20 % případů dochází k fatálnímu intrakraniálnímu krvácení.

### PASIVNÍ ALOIMUNNÍ TROMBOCYTOPENIE (PAT)

Pasivní aloimunní trombocytopenie patří také do potransfuzních reakcí. Je charakterizována trombocytopenií, která nastává během několika hodin po transfuzi krevního přípravku, v němž jsou přítomny specifické antitrombocytové protilátky. Ty pak reagují s příslušnými antigeny na trombocytech příjemce a způsobují jejich destrukci. Byly popsány případy pasivní aloimunní trombocytopenie způsobené protilátkami anti-HPA-1a a anti-HPA-5b.

### S TRANSPLANTACÍ ASOCIOVANÁ ALOIMUNNÍ TROMBOCYTOPENIE (TAT)

S transplantací asociovaná aloimunní trombocytopenie může vzácně nastat u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk v případě, že zbytkové lymfocyty příjemce tvoří aloprotilátku proti inkompatibilním antigenům trombocytů dárce. Byly popsány případy způsobené aloprotilátkami anti-HPA-1a a anti-HPA-5b.

#### Literatura

1. Curtis BR, McFarland JG. Human Platelet Antigens-2013 Vox Sang. 2014;106(2):93–102.
2. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of Human Platelets Antigens, Vox Sang. 2003;85(3):240–245.
3. Porcelijn L, von dem Borne AE. Baillieres Clin Haematol. Immune-mediated thrombo-

cytopenias: basic and immunological aspects 1998;11(2):331–341.

4. Warkentin TE, James WS. The alloimmune thrombocytopenic syndromes. Transfusion Medicine Reviews, 1997;11(4):298–307.
5. Peterson JA, McFarland JG, Curtis BR, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. Br J Haematol. 2013;161(1):3–14.
6. Novotny VMJ, van Doorn R, Witvliet MD, et al: Occurrence of Alloeneic HLA and Non-HLA Antibodies After Transfusion of Prestorage Filtered Platelets and Red Blood Cells: A Prospective Study, Blood 1995;85:1736–1741.
7. Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients 2001 Transfusion 41:766–770.
8. Hawkis J, Aster R, Curtis B. Post-transfusion purpura: current perspectives. Journal of Blood medicine 2019;10:405–415.
9. Lucas G, Culliford S, Green F, et al. Recipient-derived HPA-1a antibodies: a cause of prolonged thrombocytopenia after unrelated donor stem cell transplantation. Transfusion 2010;50:334–339.

## HLA sérologické vyšetření při haploidentické transplantaci krvetvorných buněk

Miarková E.

Oddělení Imunohematologie, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Transplantace kostní dřeně či krvetvorných progenitorových buněk z periferní krve (HSCT) je léčebný výkon vhodný pro širokou škálu hematologických onemocnění i pro vrozené poruchy imunity a metabolismu. Transplantace krvetvorných buněk se dělí podle dárce na autologní, kdy jde o převod vlastní krvetvorné tkáně nemocného, alogenní od zdravého dárce a syngenní od zdravého jednovaječného dvojčete. Pro některé diagnózy je transplantace krvetvorných buněk jedinou dosud známou příčinnou léčbou. Na druhé straně, zejména alogenní transplantace s sebou nese riziko četných, někdy až fatálních komplikací.

U alogenní transplantace dochází kromě transplantace krvetvorných buněk i k transplantaci buněk imunitního systému. Cílem je kromě obnovy

krvetvorby i správná funkce imunitního systému v těle příjemce, včetně prevence relapsu onemocnění díky tak zvanému efektu štěpu proti nádorovému onemocnění / leukémii (*graft versus leukemia* – GvL). Ke komplikacím alogenní transplantace patří potencionálně až smrtelná reakce štěpu proti hostiteli (*graft versus host disease* – GvHD), dále reakce příjemce proti podanému štěpu (*host versus graft reaction* – HvG), která může vést k selhání štěpu a jeho odhojení a také výskyt závažných infekčních komplikací. Aby se co nejvíce omezila rizika spojená s podáním alogenního štěpu a přitom se zachoval žádoucí GvL efekt, je třeba pečlivě volit jak přípravný předtransplantační režim, tak i profylaktickou potransplantační imunosupresi a léčbu případné chronické GvHD.

Pro úspěšnost alogenní HSCT má zásadní vliv použitý dárce. Výběr vhodného dárce krvetvorných buněk ovlivňuje řada faktorů, z nichž nejdůležitější je míra shody v HLA znacích bílých krvinek mezi pacientem a dárce. Ideálním dárce alogenní krvetvorné tkáně je HLA identický sourozenec. Další možností je HLA shodný nepříbuzný dárce. Podle transplantačního protokolu Ústavu hematologie a krevní transfuze a Kliniky dětské hematologie a onkologie ve FN Motol se všichni pacienti potencionálně indikovaní k transplantaci a nejbližší příbuzní pacientů (sourozenci, rodiče a děti) genotypizují v lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 a -DPB1. HLA shodného, příbuzného či nepříbuzného dárce lze v současné době nalézt pro přibližně 70 % pacientů indiko-



vaných k HSCT. Pokud není k dispozici HLA shodný dárce, hledá se mezi tzv. haploidentickými příbuznými, kteří sdílí jednu polovinu genů (otcovskou či mateřskou) pro HLA antigeny, tzv. haplotyp. Haploidentičtí jsou vždy rodiče se svými dětmi. Statisticky v polovině případů jsou haploidentičtí sourozenci. Z druhé poloviny sourozenců je statisticky jedna čtvrtina HLA shodná a jedna čtvrtina HLA neshodná. Pokud není k dispozici haploidentický dárce, či jej nelze využít např. z důvodu pozitivního lymfocytotoxického crossmatch testu mezi pacientem a dárce, hledá se částečně shodný (9/10) nepříbuzný dárce.

Pokud je k HSCT využít haploidentický dárce, je potřeba k potlačení nežádoucích imunitních reakcí (GvHD i HvG) zavést speciální režim, jehož základem je potransplantační podání cyklofosfamidu (PTCy). Cyklofosfamid je alkylační činidlo, které poškozuje DNA proliferujících buněk. Podáním cyklofosfamidu pacientovi v přesně určenou dobu po převodu krvetvorných buněk dojde k postupnému nastolení tolerance vůči neshodným HLA antigenům dárce [1]. Zavedení potransplantačního režimu s cyklofosfamidem tak umožnilo masivní rozvoj haploidentických transplantací v posledních letech. V ÚHKT byla první haploidentická transplantace provedena v roce 2014 a od roku 2015 je zavedena jako standardizovaný postup.

Protože mnoho pacientů čekajících na HSCT je polytransfundovaných, popř. mají v anamnéze těhotenství či předchozí transplantaci, je u pacientů s haploidentickým či částečně HLA shodným dárce potřeba vyšetřit i přítomnost HLA protilátek s důrazem na donor specifické protilátky (DSA). Přítomnost donor specifických protilátek proti neshodným HLA antigenům dárce negativně ovlivňuje přijetí štěpu a DSA jsou považovány za rizikový faktor pro rejekci či selhání štěpu [2]. Celkově má tedy přítomnost donor specifických HLA protilátek negativní vliv na celkové přežití.

HLA protilátky lze vyšetřit testy využívajícími lymfocyty dárce a testy pevné

fáze. Na dárcovských lymfocytech je založen lymfocytotoxický test a metody průtokové cytometrie. Lymfocytotoxický test je přes půl století využíván test umožňující jak detekci a identifikaci HLA protilátek, tak lymfocytotoxickou křížovou zkoušku (crossmatch) mezi lymfocyty dárce a sérem příjemce [3]. Pokud se v séru pacienta vyskytují komplement vázající, donor specifické HLA protilátky, tak reagují s komplementárními antigenními strukturami exprimovanými na povrchu dárcovských lymfocytů. Komplex antigen-protilátka pak aktivuje komplement a následuje lýza buňky zviditelněná pomocí vitálního barvení. Obarvená buňka tedy značí pozitivní reakci. V případě, že nedojde k reakci protilátky s antigenem a buněčná membrána zůstane intaktní, nedochází k penetraci barviva a neobarvená buňka značí negativní reakci.

Pomocí panelu lymfocytů získaných od dárce krve otypovaných na HLA antigeny lze v séru pacientů zjistit aktuální přítomnost cytotoxických HLA protilátek. Po rozšíření panelu lymfocytů lze určit specifitu cytotoxických HLA protilátek. Problematická může být specifikace protilátek u vysoce imunizovaných pacientů, kde dochází k reakci se širokým spektrem dárcovských lymfocytů. Mezi nevýhody lymfocytotoxického testu patří poměrně nízká senzitivita, potřeba viabilních dárcovských lymfocytů a detekce i non-HLA protilátek. Přidáním sekundární protilátky (anti-human IgG) lze zvýšit citlivost lymfocytotoxického testu a detekovat i HLA protilátky neaktivující komplement.

Průtoková cytometrie umožňuje pomocí fluorescenčně značených sekundárních protilátek HLA protilátky nejen detekovat, ale i kvantifikovat a identifikovat. Vyšetření donor specifických HLA protilátek metodou průtokové cytometrie poskytuje obecně vyšší senzitivitu než lymfocytotoxický test.

Testy pevné fáze využívají solubilizované HLA molekuly imobilizované na pevnou matici. Tou může být mikrotit-

rační destička (ELISA metody) nebo polystyrenové mikrokuličky (tzv. bead-array techniky využívající průtokový cytometr nebo fluorescenční analyzátor Luminex). Komerčně dodávaná in vitro diagnostika umožňuje screening a identifikaci nejen běžně se vyskytujících, ale i mnoha vzácných HLA protilátek proti antigenům lokusů HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ a -DP.

Testy pevné fáze jsou obecně citlivější než testy využívající buňky dárce a mohou poskytovat i semikvantitativní hodnocení detekovaných protilátek. K nevýhodám těchto testů patří například různá hustota HLA antigenů na testovaných površích a nespecifické interakce s molekulami obsaženými v séru [4]. Testy pevné fáze detekující komplement vázající protilátky (pomocí C1q, C3d a C4d) mohou napovědět klinický dopad protilátek a je vhodné je vyšetřit zejména u pacientů se silnými donor specifickými HLA protilátkami. Možnost semikvantitativního hodnocení síly protilátek je spojena s volbou hodnoty cut-off. V tomto ohledu není mezi laboratořemi jasná shoda, neboť různá pracoviště používají různé kity od různých výrobců. Z toho důvodu je vhodná účast v externím hodnocení kvality a/nebo v mezilaboratorním porovnávání. Na ÚHKT se používají kity pro screening a identifikaci HLA protilátek I. a II. třídy od firmy Immucor a výrobcem doporučený program pro vyhodnocení.

Při výběru vhodného dárce se na ÚHKT v rámci HLA sérologického vyšetření před haploidentickou HSCT provádí lymfocytotoxický crossmatch mezi neseparovanými T a B lymfocyty dárce a sérem příjemce. V případě pozitivního výsledku se křížová zkouška opakuje se sérem ošetřeným dithiothreitem (DTT). Reakce v přítomnosti DTT umožní odlišit protilátky třídy IgG, které jsou považovány za klinicky významnější, od protilátek třídy IgM, u kterých se předpokládá menší klinický význam. Pozitivní lymfocytotoxický crossmatch (způsobený IgG protilátkami) je považován za kontraindikaci k transplantaci

s tímto dárce. Dále se vyšetřují HLA protilátky lymfocytotoxickým testem a pomocí testů pevné fáze s využitím přístroje Luminex. V případě pozitivního výsledku pro screening protilátek HLA I. a II. třídy následuje identifikace a semi-kvantitativní hodnocení detekovaných protilátek s důrazem na donor specifické protilátky, případně určení komplement aktivujících HLA protilátek pomocí vazby C3d.

Pro pacienty s pozitivním crossmatch testem nebo výskytem klinicky významných donor specifických protilátek je hledán alternativní dárce. Při nedostup-

nosti náhradního dárce se zvažuje desenzibilizační přípravný režim pacienta, který většinou umožní redukcí či dokonce odstranění donor specifických protilátek, a tím i snížení rizika odhojení či selhání štěpu.

Jelikož jsou někteří pacienti v době mezi prvním HLA sérologickým předtransplantačním vyšetřením a datem převodu krvetvorných buněk závislí na transfuzní terapii, je vyšetření HLA protilátek (lymfocytotoxický test a screening, případně identifikace HLA protilátek na Luminexu) opakováno 8 dní před datem transplantace.

## Literatura

1. Nunes NS, Kanakry CG. Mechanisms of graft-versus-host disease prevention by post-transplantation cyclophosphamide: an evolving understanding. *Front. Immunol.* 2019;10:2668.
2. Ciurea SO, Cao K, Fernandez-Vina M, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Consensus Guidelines for the Detection and Treatment of Donor Specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in Haploidentical Hematopoietic Cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(5):521–534.
3. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine.* 1969;280(14):735–739.
4. Wehmeier C, Hönger G, Schaub S. Ceveats of HLA antibody detection by solid-phase assays. *Transplant International.* 2020;33:18–29.

## Pozdní potransfuzní hemolytické reakce

Řehořová, L.<sup>1</sup>, Procházková, R.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Transfuzní oddělení; Krajská nemocnice Liberec, a. s., Liberec

<sup>2</sup> Fakulta zdravotnických studií; Technická univerzita v Liberci

Hemoterapie i přes významný pokrok v rozvoji vyšetřovacích technik přináší jistá rizika. Ani dokonalé předtransfuzní vyšetření nemusí odhalit všechna nebezpečí.

Pojmem potransfuzní reakce jsou označovány všechny neočekávané účinky související s podáním transfuzních přípravků. Velká část potransfuzních reakcí je zprostředkována imunitně, cílem sdělení je zaměřit se na pozdní hemolytické potransfuzní reakce a uvést příklady z klinické a laboratorní praxe a diskutovat možnosti jejich eliminace či snížení.

Z imunohematologického pohledu je rizikem transfuze vznik komplikace spojené s antigeny a/nebo protilátkami, obsaženými v transfuzním přípravku. Jde o antigeny erytrocytů, leukocytů a trombocytů a o protilátky proti těmto antigenům. V důsledku toho dochází buď k tvorbě protilátek nebo k rozpadu či aglutinaci krevních buněk vyvolaným podanými protilátkami.

Komplikace, navozené transfuzí, můžeme rozdělovat jednak podle časové souvislosti s podáním transfuze (akutní

a pozdní), a jednak podle klinické závažnosti (závažné a lehké). Panuje obecné povědomí, že akutní komplikace bývají většinou závažné a pozdní méně závažné. Je však třeba si uvědomit, že tomu tak není ve všech případech, že některé akutní reakce nemusí být těžké (nehemolytická febrilní potransfuzní reakce vyvolaná anti-HLA protilátkami) a naopak některé pozdní reakce mohou ohrozit život (pozdní hemolytická reakce u polymorbidního oslabeného pacienta, event. transfuzí navozená aloimunitizace u ženy může představovat ohrožení života plodu v případných následných těhotenstvích).

Za závažnou potransfuzní reakci se považuje nežádoucí odezva pacienta vedoucí ke smrti, ohrožení života, vyžadující hospitalizaci nebo prodloužení hospitalizace, mající za následek trvalé či významné poškození zdraví nebo omezení schopností pacienta. Ostatní reakce se považují za nezávažné (lehké).

Akutní potransfuzní komplikace vznikají již v průběhu transfuze nebo v krát-

kém odstupu po ní (v řádu minut či desítek minut), obecně se za akutní reakce považují reakce vzniklé do 24 hodin od podání transfuze.

Akutní potransfuzní hemolytická reakce je charakterizována intravaskulární hemolýzou a možností rozvoje život ohrožujících stavů šoku, renálního selhání a DIC. Předpokladem vzniku akutní hemolytické reakce je „připravený terén“ pro antigen-protilátkovou reakci – již vytvořené protilátky u příjemce a inkompatibilní antigeny na erytrocytech dárce. Další podmínkou je aktivace komplementové kaskády. Naprosto nejčastější příčinou je podání ABO inkompatibilních erytrocytů. Je to dáno tím, že aglutininy anti-A a anti-B mají velmi dobrou schopnost aktivovat komplementovou kaskádu a zároveň jsou hustě exprimovány na erytrocytu (cca 1 milion na krvítku). Z dávnější praxe naše transfuzní zařízení pamatuje i smrtelnou hemolytickou reakci po podání transfuze při záměně pacientů na klinickém oddělení (systém ABO), akutní reakci (třesavka,

dušnost) při podání Ge<sup>+</sup> erythrocytového přípravku příjemci s vysokým titrem aloprotilátek proti tomuto antigenu s vysokou frekvencí výskytu a obdobnou reakci při podání Le(a<sup>+</sup>) erythrocytového přípravku příjemci s raritní, klinicky významnou anti-Le(a) protilátkou. Dle našich zkušeností se akutní hemolytické reakce nevyskytují tak sporadicky, jak uvádí literatura, řada jich může být způsobena právě výskytem protilátek proti antigenům s vysokou frekvencí výskytu či raritními protilátkami.

Pozdní potransfuzní komplikace pak nastávají s odstupem několika dnů (nejčastěji po 5–7 dnech, může ale být až po 14 dnech) po podání transfuze, obecně se za pozdní reakce považují reakce vzniklé za více než 24 hodin od podání transfuze.

Mezi potransfuzní komplikace z imunohematologických příčin patří pozdní potransfuzní hemolytická reakce a aloimunizace proti antigenům krevních buněk. Podmínky pro vznik těchto pozdních komplikací nastávají téměř u všech alogenních transfuzí. Příčinou je existence mnoha rozdílných antigenů erythrocytů – v současné době je popsáno více než 360 antigenů, řazených do třicítky systémů, několika kolekcí a dále do souborů antigenů s nízkou a vysokou frekvencí výskytu. Jedinou výjimku tvoří transfuze od jednovaječného dvojčete, v ostatních případech existuje vysoká pravděpodobnost, že transfundovaný přípravek ponese nějaký antigen, který příjemce nemá a může proti němu vytvářet protilátky. Naštěstí existují jak významné rozdíly v imunogenicitě jednotlivých antigenů, tak i ve vnímavosti jednotlivých příjemců k tvorbě protilátek.

Patofyziologie pozdní potransfuzní hemolytické reakce:

1. Absence průkazu protilátek při předtransfuzním vyšetření, přičemž se organizmus již s daným antigenem setkal (gravidita, transfuze) a vytvořil si aloprotilátky, které časem vymizely z oběhu. Důvodem nezachycení je nejčastěji to, že jsou již pod hranicí de-

tekovatelnosti, zcela výjimečně laboratorní chyba či snížená citlivost předtransfuzních testů. Schopnost tvorby protilátek však přetrvává díky sekundární „anamnestické“ imunologické odpovědi. U pacientů s AIHA s volnými autoprotilátkami se k testu kompatibility používá vysycená plazma nebo sérum, ale i precizně provedené adsorpční testy mohou způsobit diluci vyšetřované plazmy nebo séra, a tím i diluci případné skryté aloprotilátky, která nemusí být ve vysycené plazmě nebo séru detekována.

2. Protilátky se vážou na transfundované erythrocyty, tzn. pokud je protilátek méně než erythrocytů, protilátky se adsorbují na erythrocyty a vymizí z plazmy příjemce. Hemolyzuje proto jen část erythrocytů a část erythrocytů po vysycení protilátek dočasně normálně přežívá. Dárcovské erythrocyty představují silný antigenní podnět, a tak nastane mohutná tvorba specifických protilátek cca 5. den po transfuzi a druhá část erythrocytů se rychle odstraní z oběhu. Proto dojde ke zvýšení koncentrace bilirubinu a je pozitivní PAT (způsobeno navázáním vytvořených protilátek na erythrocyty).

Pozdní potransfuzní hemolytická reakce je charakterizována extravaskulární hemolýzou, raritně může být i intravaskulární hemolýzou vedoucí k poklesu hodnot hemoglobinu, eventuálně anémii a mírnému ikteru nejčastěji v odstupu 5–7 dní, ale i 2–3 týdny po transfuzi. Jiné klinické příznaky se objevují jen vzácně (teplota, zimnice). Obvyklou příčinou je nepravidelná antierythrocytární protilátka, která nevyvolává intravaskulární hemolýzu. Nejčastěji jsou to anti-Rh protilátky, protilátka anti-K, -Jk, -Fy, vzácněji jiné specifity (třídy IgG, reagující při 37 °C v NAT). K vytvoření protilátky může dojít až po podání transfuzního přípravku, podané erythrocyty mohou cirkulovat v oběhu příjemce i 5–6 týdnů, reakce je pak opožděná a bývá méně nápadná. Reakce může být vyvolána i vysokými dávkami

i.v. imunoglobulinů (obsahují anti-A a anti-B). Laboratorním průkazem je pokles hodnot červeného krevního obrazu, vzestup nepřímého bilirubinu, vzestup LDH, pokles haptoglobinu, hemoglobinurie, urobilinogen v moči, pozitivní PAT, průkaz antierythrocytární protilátky.

Jen vzácně může probíhat pod obrazem prudší hemolýzy s ohrožením vitálních funkcí, raritně s intravaskulární hemolýzou (obvykle u anti-Kidd protilátek). Pozdní hemolýzu zprostředkují totiž aloprotilátky třídy IgG, navázané na inkompatibilní antigen/y na natransfundovaných erythrocytech a rozpoznávané Fc-gamma receptory monocytů a makrofágů. Následuje fagocytóza takto senzibilizovaných krvinek a jejich extravaskulární rozpad v orgánech RES, zejména ve slezině. K pozorovatelné hemolýze dochází až při vazbě více než 100 molekul IgG3 na jednu krvinku, u podtřídy IgG1 musí být počet molekul několikrát a u IgG2 a IgG4 dokonce několiksetkrát vyšší. Proto málokdy dochází k pozdní potransfuzní hemolytické reakci v průběhu primární imunizace, ale dochází k ní až při sekundární protilátkové odpovědi.

Doporučeným postupem je sledování parametrů červeného krevního obrazu, hepatálních a renálních funkcí a koagulačního profilu. Terapie je obvykle symptomatická, v případě potřeby monitorování koagulačního statusu, popř. transfuze erythrocytů bez antigenu, proti kterému je namířena protilátka.

Prevence pozdních potransfuzních komplikací je dvojího typu – prevence primární a sekundární imunizace. Rutinně se brání primární imunizaci zatím pouze u jednoho erythrocytárního antigenu, a to u antigenu RhD. Je to způsobeno tím, že se výrazně liší od všech ostatních antigenů. RhD pozitivní erythrocyt se liší od RhD negativního přítomností jednoho celené proteinu (cca 400 AK), kdežto všechny ostatní systémy se liší pouze v jedné nebo několika málo aminokyselinách v sekvenci membránových proteinů či rozdílu v terminálním cukru u sacharidových antigenů. Imu-

nogenicita RhD antigenu je udávána až 80 %, u ostatních antigenů je o řád a více nižší. Proto bráníme primární imunizaci tím, že RhD negativním příjemcům, je-li to možné, podáváme RhD negativní přípravky, a že RhD negativním těhotným je standardně podávána anti-D profylaxe. Rovněž by tak měla být podána anti-D profylaxe u dívek a mladých RhD negativních žen, kterým byly podány RhD pozitivní trombocytární přípravky, i když příměs erytrocytů nemusí být vždy okem viditelná.

U ostatních antigenů je zatím zavedena pouze prevence sekundární imunizace, v těhotenství jiná než anti-D profylaxe neexistuje. Dle doporučení STL ČLS JEP je vhodné uvažovat o primární transfuzní prevenci u dívek a mladých žen ve vybraných specifikách, zejména u antigenu K (nepodávat tento antigen příjemkyním, které jej nemají). Prevenci sekundární imunizace je jednak důkladné předtransfuzní vyšetření, ale také důkladná anamnéza zaměřená na předchozí transfuze či těhotenství, která při-

náší informaci o tom, že u příjemce byl v minulosti pozitivní protilátkový nález (protilátky pod hranicí detekovatelnosti; ideálním stavem je vystavení průkazky o přítomnosti protilátky a záznam do zdravotnické dokumentace), a u dříve imunizovaných pacientů výběr transfuzních přípravků podle fenotypu. Na pozitivní screening antierytrocytárních protilátek musí navazovat identifikace protilátky a posouzení její klinické významnosti, v určených případech výběr přípravku negativního pro daný antigen, a nakonec zkouška kompatibility erytrocytů přípravku s plazmou/sérem příjemce metodou NAT. V mimořádných situacích (mnohočetné protilátky, protilátky proti antigenu s vysokou frekvencí výskytu, autoprotilátky) u krvácejícího či anemického pacienta je nutné zvážit, zda riziko nepodání či pozdního podání transfuze není vyšší než riziko pozdní potransfuzní hemolýzy.

V naší laboratorní praxi jsme se v nedávné době setkali s pozdní potransfuzní hemolytickou reakcí vyvolanou proti-

látkou anti-Jk(a), která nebyla v rámci předtransfuzního vyšetření detekována, a příjemci byly podány Jk(a) pozitivní transfuzní přípravky. V případě nespecifických reakcí v NAT, které jsme v laboratorním vyšetření prokazovali, je pro tyto případy vhodné použít i jiný dg. systém, je-li k dispozici. V našem případě jsme upřednostnili zaslání k dovyšetření do RL pro imunohematologii ÚHKT Praha. Aloprotilátka anti-Jk(a) byla navíc vyloučena provedenými adsorpčními testy a zkouškami kompatibility. Potransfuzní reakce byla zaléčena a pacientka neměla další vážné komplikace.

### Literatura

1. Procházková R, Galuszková D, Gašová Z, Masopust J, Turek P. Doporučený postup při řešení a vyšetřování potransfuzních reakcí /Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP/. *Transfuzie Hematol Dnes* 2020;26(3):242–256.
2. Masopust J, Písačka M. Praktická imunohematologie Erytrocyty: 270–277.
3. Procházková R, Řehořová L. Klinická transfuziologie pro všeobecné sestry: 42–47.
4. Písačka M. Imunohematologická rizika transfuzí. *Transfuzie a Hematol Dnes* 2008;14: 170–172.

## Nerutinní metody v referenční laboratoři pro imunohematologii

Písačka M.

*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

Ústav hematologie a krevní transfuze byl založen 1. 1. 1952 jako rezortní výzkumný ústav se zaměřením na transfuziologickou problematiku. Klinický úsek byl otevřen v roce 1955. Důležitým propojovacím prvkem bylo oddělení imunohematologie, které zajišťovalo potřebná předtransfuzní vyšetření. Postupně se jeho působnost rozrostla na poskytování superkonziliárních služeb pro ostatní transfuzní a hematologická zařízení tehdejšího Československa. V Souboru závazných opatření a metodických pokynů pro Transfuzní službu

(Dobry, Novák a kol., Avicenum 1976) je zmiňována možnost konzultace při řešení otázek specifity protilátek v „Národní skupinové referenční laboratoři Ústavu hematologie a krevní transfuze“. Tato referenční činnost byla formalizována v roce 1993 souhlasem se zřízením Referenční laboratoře pro imunohematologii dopisem Ministerstva zdravotnictví /PKP/2-210-8.1.93(5/8)/.

Kromě zmíněného zajišťování superkonziliárních analýz má Referenční laboratoř (RL) pro imunohematologii důležitou roli v zajišťování kvality imu-

nohematologických vyšetření. V minulosti (až do konce osmdesátých let minulého století) působila RL na poli zajištění kvality používaných diagnostik. V „předmonoklonální“ éře byla celá řada protilátkových polyklonálních diagnostik „in house“ původu, tedy vyráběná jednotlivými pracovišti československé transfuzní služby. K tomu, aby při tomto postupu byla zajištěna standardnost vyšetření ve všech laboratořích, musela vyráběná diagnostika splňovat požadavky Československých státních norem co do specifčnosti, avidity a síly reakcí. Právě

zajištění shody s ČSN u všech celostátně vyráběných diagnostik bylo laboratorně kontrolováno v RL a následně bylo udělováno povolení k použití v klinické diagnostice. Kromě kontroly „in-house“ reagií působila RL i v oblasti posuzování importovaných imunohematologických diagnostik. Aktivity RL v oblasti povolování a posuzování diagnostik po zavedení povinného používání reagií s CE certifikací ustoupily do pozadí, nicméně stále většina distributorů imunohematologických diagnostik požaduje testování nově zaváděných reagií a systémů v RL. To umožňuje RL mít informace a vlastní zkušenosti s diagnostikami používanými v rutinních laboratořích naší transfuzní služby, čímž je zefektivňována její superkonziliární činnost.

Druhou oblastí na poli zajištění kvality v imunohematologii je činnost RL v externí kontrole imunohematologických vyšetření. V roce 1992 z iniciativy ÚHKT byl zahájen projekt mezilaboratorního porovnávání základních laboratorních vyšetření v erytrocytární imunohematologii. Tyto cykly se nejprve odehrávaly kompletně v režii RL ÚHKT, od roku 1994 se přešlo na praktičtější uspořádání externí kontroly navázáním spolupráce se SEKK Pardubice. RL v současné době připravuje kontrolní vzorky a zajišťuje supervizi cyklů /kontrolu výsledků, komentáře k cyklům/, SEKK distribuuje vzorky, shromažďuje a statisticky zpracovává výsledky a zajišťuje distribuci osvědčení o účasti a certifikátů úspěšnosti. V současnosti jsou v režii RL organizovány ročně 4 cykly IH (základní imunohematologická vyšetření antigenů a protilátek) a 2 cykly PAT (zaměřené na diagnostiku protilátkové a komplementové senzibilizace erytrocytů).

Důležitou úlohou ÚHKT je vedení Národního registru dárců vzácných krevních skupin. Věstníkem MZd č.30/1966 byly vydány pokyny k budování tohoto registru, kdy regionální (krajské) registry vedly transfuzní zařízení krajských nemocnic (tehdy NsP III. typu) a národní registr byl shromažďován v RL v ÚHKT (tehdy pod názvem Ná-

rodní skupinová laboratoř Ústavu hematologie a krevní transfuze). Registr byl veden nejprve formou jednotných děrovacích karet a poté na centrálním počítači v Plzni (v obou případech s roční „papírovou“ aktualizací v RL ÚHKT a tiskem distribuovaného seznamu); následně na počítačích Apple v krajských zařízeních transfuzní služby (každoroční aktualizace v RL ÚHKT prostřednictvím zaslání disket) a konečně formou elektronické komunikace (programy Transnet a TransReg).

V Referenční laboratoři je používána široká škála imunohematologických laboratorních metod. Tento článek se bude zabývat částí erytrocytové imunohematologie. Používané metody je možné rozdělit na rutinní metody, za použití komerčně vyráběných diagnostik – protilátkových pro stanovování antigenů erytrocytů a krvinkových (erytrocytů nebo jejich membrán) pro screening a identifikaci protilátek, a potom na metody „nerutiní“, používané v případech, na které nestačí dostupná komerční diagnostika.

Předpokladem pro diagnostiku komplikovaných protilátkových vyšetření je dostatečný soubor dárců a popřípadě krvinkových vzorků. K tomuto účelu má RL vlastní registr více než 150 dárců s kompletně otypovaným fenotypem a ve většině případů i genotypem. Z těchto dárců je sestavován vlastní identifikační panel a jsou odebírány čerstvé vzorky. Ty slouží pro přímou diagnostiku protilátek a jejich směsí metodami sloupcové aglutinace i zkumavkovými testy a také pro vysycování alo- a/nebo autoprotilátek v situaci, kdy nelze použít erytrocyty vyšetřovaného pacienta (polytransfundovaní příjemci, erytrocyty masivně senzibilizované protilátkami nebo komplementem, aj.). Někdy však dochází k situacím, kdy ani komerčně dostupné identifikační panely, ani aktuálně odebraný vlastní panel nestačí pro vyřešení komplikovaných protilátek nebo jejich směsí. Proto máme ještě kryokonzervované vzorky krvinek v tekutém dusíku. Jsou to jednak krvinky našich panelových dárců (více než 150),

dále z případů, vyšetřovaných v naší laboratoři (více než 300) a konečně krvinky z celosvětové vzájemné výměny vzácných vzorků (SCARF, více než 200). Vzácnost těchto vzorků je stejná jako u vzácných dárců transfuzních přípravků (kombinace homozygotie ve více antigenních systémech, negativita pro antigeny s vysokou frekvencí výskytu), ale také to je „laboratorní“ vzácnost – erytrocyty s přítomností raritních antigenů s nízkou frekvencí výskytu.

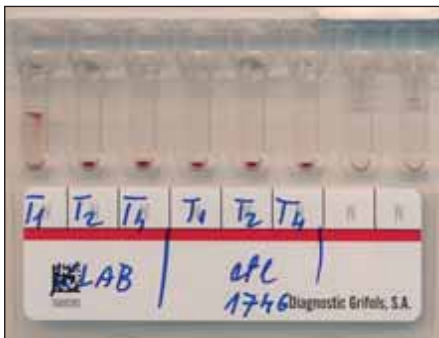
Ke komplementárnímu vyšetření atypických případů antigenů používáme zamražené vzorky sér se vzácnými protilátkami (více než 300 z případů naší laboratoře a téměř 100 z mezinárodní výměny SCARF).

Kromě biologických vzorků krvinek a sér s protilátkami (tedy klasické sérologické vzorky) máme dostupné „průmyslově vyrobené“ diagnostické materiály – monoklonální protilátky používané hlavně k detekci variantních D antigenů (tyto jednak komerční a potom z dvou mezinárodních workshopů, téměř 100 různých klonů) a nově i rekombinantní antigenní substance.

Nejčastější „nerutiní“ metodou je vysycování protilátek. Ve většině případů jde o případy pacientů s autoimunitní hemolytickou anémií (AIHA), kdy pro pozitivní reakce se všemi nebo téměř všemi krvinkami nelze provést běžná předtransfuzní vyšetření. K vysycení používáme buďto vlastní krvinky pacienta, který ještě nedostal transfuze, nebo krvinky našich panelových dárců. Provádí se opakované inkubace vyšetřovaného séra s příslušnými krvinkami při teplotách odpovídajících teplotnímu optimu protilátky, kterou chceme odstranit. Účinnost vysycení je možné zvýšit enzymovým opracováním erytrocytů, samozřejmě ne u protilátek proti enzym-senzitivním antigenům. Po úspěšném vysycení je možné provést požadovaná předtransfuzní vyšetření. Vždy je však třeba myslet na možnost dilučního efektu, hlavně v případech, kdy k odstranění pozitivních reakcí bylo potřeba více vysycovacích cyklů.

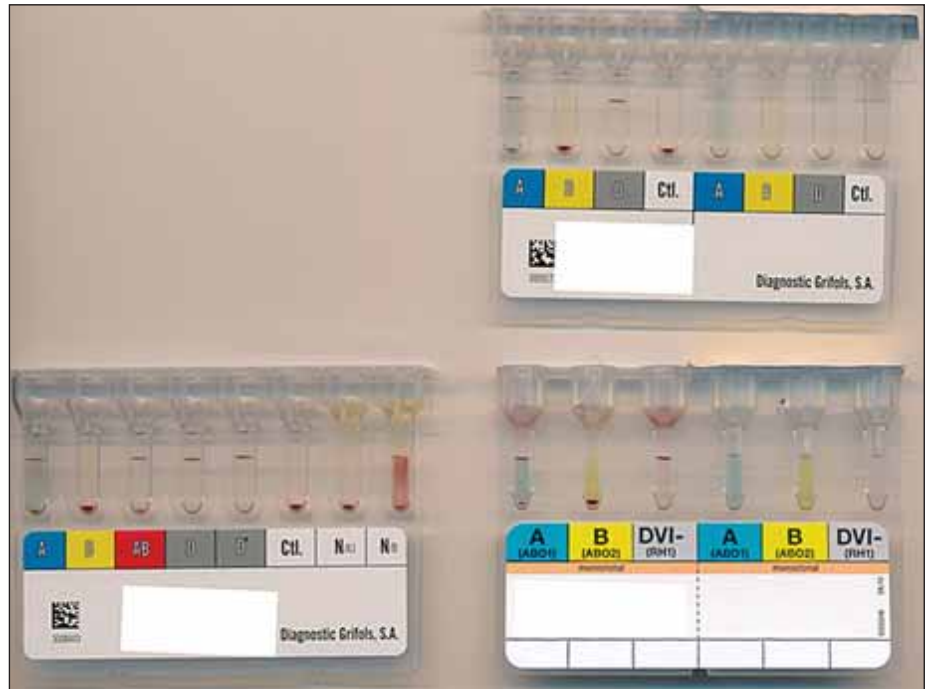


Obr. 1.



Obr. 3.

S případy AIHA úzce souvisí i další nerutinní metoda – i když v tomto případě jde o postup v mnoha laboratořích již běžný – a to genotypování. Používá se tam, kde nejde spolehlivě určit fenotyp (polytransfundovaní příjemci, AIHA, aj.). Historicky jsme v osmdesátých letech začínali skutečně nerutinními PCR, kdy jsme primery získali mezinárodní spoluprací s univerzitou v Innsbrucku. Nyní

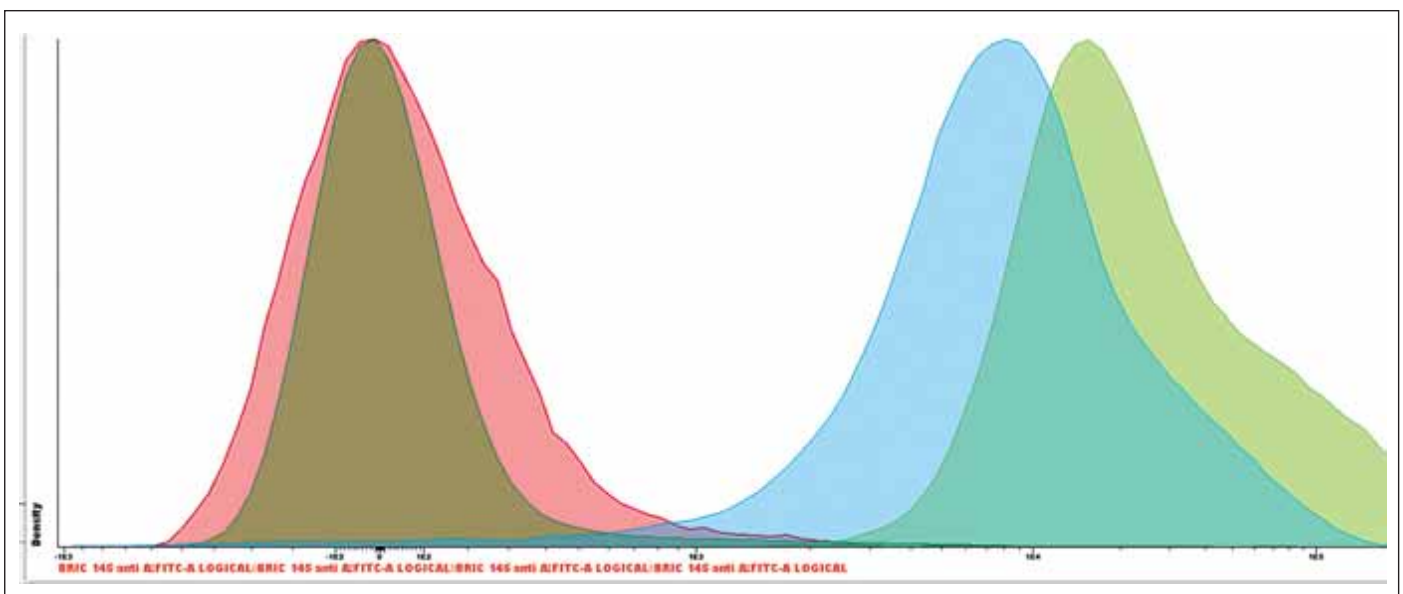


Obr. 2.

jsou již k dispozici komerční genotypovací systémy.

Další nerutinní metodou je navázání vyšetřované protilátky na erythrocyty s daným antigenem a poté vyšetření klasickými technikami pro kvalitativní a kvantitativní detekci přímého antiglobulinového testu. Tento postup slouží k predikci klinického významu protilátky (určení imunoglobulinové třídy, případně IgG podtřídy a zjištění schopnosti aktivo-

vat komplement). Jako ilustraci uvádím příklad protilátky anti-Le(a) (obr. 1). Tato většinou benigní protilátka v tomto případě vykazuje poměrně překvapivý hemolytický potenciál. Zatímco v běžném screeningu je protilátka téměř negativní v NAT a detekována v enzymovém testu (karta vlevo), po navázání na Le(a+) krvítku je odhaleno, že důvodem této reaktivity je IgM třída protilátky, která v tomto případě účinně aktivuje komplement.



Obr. 4.

Vysycovací postup je možné použít i k odlišení dvojí populace erytrocytů. Tato může být pozorována po transfuzích, po transplantaci hemopoetických buněk, nebo u vzácných případů vrozeného chimerismu. Příkladem je raritní případ dárce krve, u kterého byl prokázán raritní tetragametický chimerismus. To je stav, kdy ve stádiu zygot dojde ke spojení dvou jedinců do jednoho organismu. V tomto případě je chimerismus celotělový, nejen krvinkový. Jedna populace byla skupina A c- a druhá O c+, odseparování bylo provedeno selektivní aglutinací pomocí protilátek anti-A a anti-c (obr. 2).

Mezi vzácněji pozorované případy patří stavy polyaglutinace erytrocytů,

kteří mohou být parainfenční (T-polyaglutinace, např. u hemolyticko-uremického syndromu, Tx-polyaglutinace u pneumokokové infekce), nebo mohou souviset s glykosylačním defektem u myelodyplázie (Tn-polyaglutinace, Tx-polyaglutinace). K odlišení jednotlivých typů polyaglutinace se používají lektiny rostlinného i zvířecího původu. Na obr. 3 je případ perzistující Tx-polyaglutinace u pacientky s myelodysplastickým syndromem.

Další metodou, sice běžnou v hematologii, ale vzácnou v imunohematologii, je průtoková cytometrie. Touto citlivou metodou jde detekovat slabé formy antigenů. Na obr. 4 je slabý A an-

tigen, pomocí PCR-SSP charakterizován jako A<sub>weak 30</sub>. Monoklonální anti-A protilátka značená FITC detekuje slabou reaktivitu rozloženou na škále od negativy po slabou pozitivitu. Mutace A-glykosyltransferázy způsobená polymorfizmem T646A tedy způsobuje nerovnoměrnou distribuci A terminálního N-acetylgalaktosaminu.

Referenční laboratoř pro imunohematologii se stále snaží zlepšovat diagnostický servis kombinací rutinních i nerutinních, klasických i moderních laboratorních metod.

Děkujeme všem laboratořím, které nám zasílají vzácné a zajímavé vzorky.

# Low titer group O whole blood and hemostatic resuscitation during treatment of massive bleeding

Yazer M.

University of Pittsburgh, US

Low titer group O whole blood (LTOWB) is not a new blood product, thousands of units have been used to resuscitate injured soldiers in battles dating back to World War 1 [1]. However, its use in civilian settings for resuscitating patients with massive bleeding is a relatively new development. It has been most extensively studied in the trauma population, and its successful use in that setting has led to it being used in massively bleeding patients with different causes of bleeding. LTOWB has many advantages over conventional components for the resuscitation of bleeding patients (Tab. 1).

The benefits of transfusing LTOWB cannot be understated; the convenience of providing balanced resuscitation using one unit instead of three, the simplification of the logistics of the resuscitation especially in the pre-hospital phase that comes by only having to bring one unit in a crowded ambulance or helicopter instead of multiple components with different storage temperature requirements, and the reduction in

donor exposures are all important benefits of implementing an LTOWB program. The literature on the mortality benefits of LTOWB when used in the resuscitation of civilian patients is starting to be developed. A review of the American College of Surgeons Trauma Quality Improvement Program (TQIP) database during the calendar years 2015 and 2016 found 280 patients who had mostly received only one unit of LTOWB in conjunction with conventional component therapy during their resuscitation [2]. Compared to 8,214 patients who received only conventional component therapy, receipt of LTOWB in the multivariate analysis was associated with significantly decreased 24-hour and in-hospital mortality, as well as significantly reduced clinical complications, and a shorter hospital length of stay. A single-center, year-long, observational trial compared outcomes between injured LTOWB patients who received a median (IQR) of 2 (1–3) units to 253 injured adults who received balanced component therapy [3]. This study

found no difference in survival between these two groups, although the LTOWB group received fewer RBC and plasma units. There were also no differences in other important clinical outcomes such as the development of venous thromboembolism, pneumonia, sepsis, ARDS, and acute kidney injury between the two groups as has also been shown in a propensity matched study where the LTOWB patients received a median (IQR) of 4 (3–6) units [4]. In a single center observational study of 86 injured adults, LTOWB was associated with improved 24-hour and 30-day survival compared to those who were resuscitated with conventional components in an adjusted analysis [5]. In a different single center analysis of 198 injured LTOWB patients who received a median of one unit either pre-hospital or early in their in-hospital course, 30-day mortality was reduced in a multivariate logistic regression compared to 152 conventional component recipients [6].

The use of LTOWB for treating civilians with massive bleeding, particularly those in trauma, is increasing in the US. Further studies are required to demonstrate if outcomes are improved amongst recipients of LTOWB compared to recipients of conventional components. However, even if superior outcomes are not demonstrated following the transfusion of LTOWB, the simplification of the logistics of the resuscitation might well be sufficient enough grounds to implement this rediscovered product.

## References

1. Murdock AD, Berseus O, Hervig T, et al. Whole blood: the future of traumatic hemorrhagic shock resuscitation. *Shock* 2014;41(Suppl1): 62–69.

**Tab. 1. Some of the advantages of using group O whole blood over conventional components in massively bleeding patients.**

simplifies the logistics of the resuscitation by providing a balanced resuscitation fluid in one bag instead of three

more concentrated product compared to reconstituting whole blood with conventional components

provides cold stored platelets that have improved in vitro and perhaps in vivo hemostatic function compared to room temperature platelets in this patient population

provides for a longer shelf life for stored platelets compared to room temperature storage

provides for the availability of platelets where they might otherwise not have been available

reduces the bacterial contamination rate of a platelet-containing product

reduces the incidence of ABO mis-transfusion

reduces donor exposures



2. Hanna K, Bible L, Chehab M, et al. Nationwide analysis of whole blood hemostatic resuscitation in civilian trauma. *J Trauma Acute Care Surg* 2020;89:329–335.
3. Duchesne J, Smith A, Lawicki S, et al. Single Institution trial comparing whole blood vs balanced component therapy: 50 years later. *J Am Coll Surg* 2020.
4. Yazer MH, Freeman A, Harrold IM, et al. Injured recipients of low titer group O whole blood have similar clinical outcomes compared to recipients of conventional component therapy: a single-center, retrospective study. *Transfusion in press*.
5. Shea SM, Staudt A, Thomas KA, et al. The use of low-titer group o whole blood is independently associated with improved survival compared to component therapy in adults with severe traumatic hemorrhage. *Transfusion* 2020;60: S2–S9.
6. Williams J, Merutka N, Meyer D, et al. Safety profile and impact of low-titer group O whole blood for emergency use in trauma. *J Trauma Acute Care Surg* 2020;88:87–93.

## Bezpečnost hemoterapie

**Procházková R.**

*Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec, a.s.  
Fakulta zdravotnických studií, Technická univerzita v Liberci*

Hemoterapie, zejména léčba transfuzními přípravky, představuje významný proces v péči o nemocné. Její vývoj hrál významnou roli v rozvoji moderní chirurgie i v péči o chronicky nemocné. Cílem hemoterapie je dosažení maximálního léčebného účinku při co nejmenším ohrožení příjemce vedlejšími účinky této léčby – potransfuzními reakcemi (PR).

Nejvíce obávanými jsou závažné reakce, které pacienta přímo ohrožují na životě: přenos infekcí, akutní hemolytické reakce, bakteriální/septické reakce, anafylaxe, TRALI a TA-GvHD. V praxi se častěji vyskytují nehemolytické febrilní a alergické reakce, které pro pacienta představují dyskomfort, přímo jej na životě neohrožují, nicméně představují problém pro další hemoterapii zejména chronicky nemocných. Příčinu potransfuzních reakcí můžeme hledat v samotném přípravku (TRALI, TA-GVHD, septické reakce, nehemolytické febrilní či alergické reakce) nebo při procesu jeho aplikace (akutní hemolytická reakce, septická reakce).

Transfuzní přípravky (TP) jsou léčivé přípravky, jejichž výroba v zařízeních transfuzní služby (ZTS) podléhá Zák. 378/2007 Sb. O léčivech a Vyhl. 413/2008 Sb. O krvi. Na zajištění bezpečnosti hemoterapie se podílí zařízení transfuzní služby a krevní banky (KB), které zajišťují výrobu TP, předtransfuzní vyšetření a výdej TP, a dále klinická oddělení, kde jsou TP aplikovány pacientům. Celý

proces hemoterapie je sledován hemovigilancí – tj. sběrem dat o nežádoucích událostech a reakcích a jejich vyhodnocením.

Úlohou ZTS a KB je zajištění maximální možné bezpečnosti TP z hlediska přenosu infekcí přenosných krví, správného provedení předtransfuzního vyšetření a výdeje přípravku. K tomu je třeba správný výběr dárce, odběr krve a krevních složek, jejich vyšetření, zpracování a skladování.

K významnému zvýšení bezpečnosti transfuze z hlediska přenosu infekcí přispívají stále více moderní diagnostické metody včetně PCR. Přes toto všechno 100% bezpečnost transfuze v této oblasti nemůžeme očekávat vzhledem ke stále novým patogenům a měnící se epidemiologické situaci. Úkolem transfuzní služby proto je tyto trendy sledovat a přijímat/navrhovat odpovídající opatření.

Dalším krokem k zvýšení bezpečnosti hemoterapie je terapie krevními složkami, zavedení procesů jako deleukotizace TP (snížení imunogenního efektu transfuze, prevence nehemolytických febrilních reakcí, omezení přenosu některých virů), ozáření (prevence TA-GvHD), výroba klinické plazmy se sníženým rizikem TRALI, výroba promytých erytrocytů a trombocytů (snížení rizika závažných alergických reakcí) a patogenní inaktivace TP (snížení přenosu infekcí krví). Náhrada klinické plazmy při jejich masivních transfuzích derivátem Octaplas sníží výskyt alergických reakcí.

Krevní banky zajišťují bezpečnost hemoterapie správným výběrem transfuzního přípravku pro pacienta (např. výběr erytrocytových přípravků dle fenotypu u polytransfundovaných pacientů, zajištění komplikovaných pacientů s protilátkami či AIHA). K provedení předtransfuzního vyšetření jsou dnes používány moderní diagnostické metody a systémy, často automatizované, s přenosem výsledků on-line, případně elektronické žádanky.

Statistiky potransfuzních reakcí však nezjišťují největší počet pochybení v procesu výroby a výdeje TP, ale v procesu jejich aplikace. SÚKL eviduje v České republice 2 akutní hemolytické potransfuzní reakce v roce 2018, 4 v roce 2019. Nejčastější příčinou fatálních potransfuzních příhod jsou zejména záměny pacientů při odběrech vzorků a při aplikaci transfuze způsobené nedodržením stanovených postupů.

Pro bezpečnost hemoterapie je proto klíčová aplikace transfuzních přípravků na klinických pracovištích. Začíná správnou indikací přípravku, která je výhradně věcí lékaře. Optimálně by měla být indikační kritéria transfuzních přípravků vypracována na národní úrovni. V České republice jsou k dispozici doporučení pro terapii ŽOK a ŽOK v porodnictví, před dokončením je mezioborové doporučení Zásady účelné hemoterapie a patient blood management. Čerpat lze samozřejmě ze zahraničních doporučení.

Pro proces aplikace transfuze v praxi musí být stanovena jasná pravidla – určení odpovědností, pracovní postupy a kontrola jejich dodržování. K dispozici jsou doporučené postupy STL ČLS JEP pro podání transfuzních přípravků a pro řešení potransfuzní reakce.

Tato doporučení by měla být lokálně transformována do standardních pracovních postupů, jejich dokumentované proškolení by mělo být podmínkou pro přidělení kompetence pracovníka k aplikaci transfuze. Významný akcent musí být věnován segmentu ošetrovatelské péče, tzn. asistenci při aplikaci transfuze.

Pro zajištění bezpečné hemoterapie ve většině zdravotnických zařízení existují tzv. „transfuzní komise“, které vytváří lokální pra-

vidla pro účelnou hemoterapii a nastavují systém pravidelného proškolení lékařů i sester. Transfuzní komise obvykle evidují hemovigilační data, tj. informace o nežádoucích účincích a událostech, zjištěné nedostatky se promítají do školení personálu či organizačních opatření. Řada zdravotnických zařízení nastavení systému v praxi ověřuje audity zaměřenými na znalost transfuzní problematiky a správnou praxi.

Bezpečná hemoterapie v praxi je mezioborový a neustále se vyvíjející proces, kterému by měla být věnována odpovídající pozornost.

### Literatura

1. Procházková R, Řehořová L. Klinická transfuziologie pro všeobecné sestry. TUL v Liberci, 2010, 105 s. ISBN 978-80-7372-676-8.

2. Řeháček V., Masopust J. a kol. Transfuzní lékařství, Grada Publishing, 1. vydání, Praha 2013, ISBN 978-80-247-4534-3.

3. Procházková R., Kracíková J. Hemovigilance. In: Řeháček V., Masopust J. a kol. Transfuzní lékařství, Grada Publishing, 1. vydání, Praha 2013, str. 217–224. ISBN 978-80-247-4534-3.

4. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components – 20. edice 2020.

5. Doporučené postupy pro podání transfuzních přípravků. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2015\_12 ze dne 01.09.2015 verze 1. <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporu-cene-postupy/doporu-cene-postupy-pro-podani-transfuznich-pripravku-230>.

6. Postup pro řešení potransfuzní reakce. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2019\_14 ze dne 1. 5. 2019 verze 1. <https://www.transfuznispolecnost.cz/doporu-cene-postupy/postup-pro-reseni-potransfuzni-reakce-227>

## Patient Blood Management

Sedlák P.

ARO Krajská nemocnice Liberec a.s.

Obsahem sdělení je spíše než seznámení jakýsi refresh s nyní již respektovanou a evidence base podloženou multi-oborovou aktivitou pojmenovanou „Patient Blood Management“. Tento koncept byl poprvé představen a publikován již v roce 2008 v editorialech časopisu Anesthesiology [1], s hlavními cíli konceptu snížit spotřebu alogenních krevních produktů, zejména transfuzí, jejich nežádoucích účinků, outcome pacientů a samozřejmě i náklady s tímto spojené. Vlastní koncept Patient Blood Managementu se tedy skládá ze tří hlavních pilířů: 1) optimalizace pacientovy erytrocytární masy v předhospitalizačním období; 2) minimalizace krevních ztrát a optimalizace hemostázy v perioperačním období; 3) monitoring projevů anemického syndromu a snaha o toleranci nižších hladin hemoglobinu v časném pooperačním období. Nyní v roce 2021, cca o 13 let později můžeme konstatovat, že tento koncept potvrdil původní cíle, plně splňuje požadavky „evidence base medicine“

a měl by být implementován v každé nemocnici provozující operační medicínu. Jak elegantně shrnuje níže zmíněná metaanalýza, podařila se redukce spotřeby transfuzí erytrocytární masy o 39 %, snížení celkové mortality o 11 %, snížení výskytu renální insuficience o 26 %, snížení těžkých komplikací operačního výkonu o 20 %, snížení výskytu tromboembolických příhod o 25 %, snížení výskytu infekčních komplikací o 9 % a vlastní délky hospitalizace o 0,45 dne. Pro představu o objemu úspory ročních finančních nákladů hovoří data ze Švýcarska – na počtu 213 000 pacientů, tvořila finanční úspora 3,1 milionu US dolarů, a to pouze přímo na krevních produktech, bez nákladu na jejich administraci či na cenu hospitalizace při komplikacích léčby. Vzhledem k své úspěšnosti a efektivitě je koncept Patient Blood Managementu oficiálně doporučen k implementaci jak WHO (rezoluce 63.12), tak Evropskou unií, proto celá řada zemí nejen v EU zařadila tento koncept (některé i zákonnou normou)

do své oficiální strategie péče o pacienty v perioperačním období. Podrobné informace najdete na internetové adrese <http://europe-pbm.eu>.

### Literatura

1. Donat R, Spahn MD, Muñoz MD, et al. Patient Blood Management: effectiveness and future potential. Anesthesiology 2020;133:212–222.

2. Althoff FC, Holger N, Herrmann E, et al. Multimodal Patient Blood Management program based on a three-pillar strategy – a systematic review and meta-analysis. Annals of Surgery 2019;269(5):794–804.

3. Markus M, Mueller H, Meybohm P, et al. Patient Blood Management recommendations from the 2018 Frankfurt Consensus Conference. JAMA. 2019;321(10):983–997.

4. Pranjal B, Gupta BE, Vince M, et al. Patient Blood Management program improves blood use and clinical outcomes in orthopedic surgery. Anesthesiology 2018;129:1082–1091.

5. Pagano D, Milojevic M, Meesters MI, et al. 2017 EACTS/EACTA Guidelines on patient blood management for adult cardiac surgery. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2018;53(1):79–111.

6. Shander A, Van Aken H, Colomina MJ, et al. Patient blood management in Europe. Br J Anaesth. 2012;109(1):55–68. doi: 10.1093/bja/aes139.

# PROGRAM SEKCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ – HEMATOLOGIE

## Blasty v nátěru periferní krve

Horáková R., Mikulenková D.

Morfologicko-cytochemická laboratoř, ÚHKT, Praha

Naše laboratoř převážně vyšetřuje vzorky od pacientů s hematologickými či hematologickými onemocněními či s podezřeními na tato onemocnění, takže se setkáváme s nálezem blastů v nátěru periferní krve poměrně často. Z přítomnosti blastů v nátěru periferní krve je možné usoudit, zda se jedná o hematologické onemocnění,

nebo o leukemoidní reakci při septickém stavu (např. přítomností i mladších forem granulocytů při posunu doleva). Blasty jsou značně heterogenní buňky a v některých případech akutních leukémií je jejich zařazení obtížné. Při nízkém zastoupení blastických buněk v periferní krvi hodně závisí na zkušenosti hodnotícího labora-

torního pracovníka, zda zařadí buňku jako blastický element, či nikoliv. Do blastických elementů zařazujeme dle WHO Klasifikace tumorů hematopoetické a lymfoidní tkáně i leukemické promyelocyty a promonocyty. V přednášce bych Vám v několika kauzistikách ráda ukázala pestrou morfologii těchto buněk.

## Morfologie lymfocytů

Zmeškalová D.

Morfologicko-cytochemická laboratoř, ÚHKT Praha

Lymfocyty v krvi zdravého člověka tvoří 20–40 % všech leukocytů. Imunologicky je dle původu jejich vzniku dělíme na B a T lymfocyty a NK buňky, které jsou od sebe morfologicky ale někdy hůře odlišitelné, kromě LGL lymfocytů (16–18 µm s velkými granuly ve vodojasné cytoplazmě). Při morfologickém hodnocení

lymfocytů v nátěru periferní krve, který je obarvený panopticky, hodnotíme velikost a tvar lymfocytu, nukleo-cytoplazmatický poměr; všímáme si tvaru jádra, struktury jaderného chromatinu, přítomnosti jadérek, zbarvení cytoplazmy a možné granule. Správné morfologické hodnocení jednotlivých typů lym-

focytů napomáhá k odlišení lymfocytů normálních, aktivovaných, či neoplastických; a může jako první napomoci určit další postup dovyšetření, např. pomocí průtokové cytometrie, histologického rozboru tkání, ev. genetického vyšetření, které vede k potvrzení či vyloučení lymfoidní neoplázie.

## Metastazující neuroblastom v kostní dřeni

Brillantová M.<sup>1</sup>, Včelková A.<sup>1</sup>, Janírková V.<sup>2</sup>, Blažek B.<sup>3</sup>, Pulcer M.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Ústav laboratorní medicíny, Oddělení klinické hematologie, HN Ostrava

<sup>2</sup> Oddělení dětské hematologie a hematonekologie, Klinika dětského lékařství FN Ostrava

<sup>3</sup> Katedra biomedicínských oborů, LF OU

### ÚVOD

Neuroblastom patří mezi nejběžnější extrakraniální solidní nádor v dětském věku a představuje až 15 % všech úmrtí

na malignity u dětí. U pacientů do 1 roku je neuroblastom nejčastější malignitou, vyskytuje se dvakrát častěji než akutní leukémie. Zcela sporadicky se může neu-

roblastom vyskytnout i u adolescentů. V České republice se toto onemocnění ročně diagnostikuje cca u 30 dětí. Neuroblastom vychází z buněk nervové

tkáně. Primární nádor je většinou lokalizován v dutině břišní. Jsou známá 4 stádia onemocnění. Ve čtvrtém, tj. nejzávažnějším stádiu, se setkáváme s metastázemi i v kostní dřeni.

## CÍLE

Seznámit posluchače s kazuistikami, které popisují případy dvou 3letých pacientek, jejichž obtíže jednoznačně nenavědčovaly tomu, že by se mohlo jednat o maligní proces. Díky překvapivému, a ne zcela jasnému nálezu na

magnetické rezonanci a morfologickému nálezu v biopsii kostní dřene byla u obou pacientek zjištěna velmi závažná diagnóza onkologického onemocnění – neuroblastomu IV. stádia.

## METODY

Nátěry kostní dřene byly nabarveny metodou May-Grünwald a Giemsa-Romanowski s následným mikroskopickým vyhodnocením. Dále bylo provedeno cytochemické vyšetření (PAS, POX, NES).

## VÝSLEDKY

Cytochemické barvení neprokázalo diagnózu akutní leukémie. Až nález typických rozet v panoptickém barvení potvrdil diagnózu neuroblastom.

## ZÁVĚR

Časná diagnostika nádorových onemocnění dětského věku je pro jejich vzácnost a často nespecifickou symptomatologii velmi obtížná. Pro další osud dítěte, tedy šanci na vyléčení, je však zcela zásadní.

# Přínos cytochemického vyšetření železa u pacientů s anémií při nově diagnostikovaném lymfoproliferativním onemocnění

Burgerová P.<sup>1</sup>, Antošová M.<sup>1</sup>, Kissová J.<sup>1,2</sup>, Penka M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Oddělení klinické hematologie FN Brno

<sup>2</sup> Lékařská fakulta Masarykovy univerzity Brno

U pacientů s nově diagnostikovaným lymfoproliferativním onemocněním bez infiltrace kostní dřene a současnou anémií je nutné charakterizovat povahu anémie pomocí vyšetření parametrů železa. Železo je možné vyšetřit pomocí semikvantitativní metody cytochemic-

kým barvením nátěrů kostní dřene, či kvantitativními biochemickými metodami vyšetření periferní krve. Doplnění vyšetření zhodnocením železa kostní dřene barvené cytochemickou metodou u výše popsané skupiny pacientů je běžnou praxí na našem pracovišti.

Předmětem tohoto sdělení je porovnání cytochemických a biochemických metod vyšetření parametrů železa a jejich přínos.

## Grantová podpora

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNB, 65269705).

# Využití D-dimerů v triážování závažnosti COVID-19

Sečkařová M., Chalupníková P., Neplechová D., Kupková P., Zatloukalová L., Zdražilová H., Úlehlová J., Slavík L.

Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc

## ÚVOD

Současná pandemie COVID-19 vznikla v prosinci 2019 ve městě Wuhan vedle ke značnému potencování vývoje metod detekce viru i jeho projevů. Typickými znaky části pacientů s těžkou pneumonií jsou vývoj virové sepse, diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a multiorganového selhání. Koagulační parametry

ukazují abnormální výsledky související se sepsí nebo DIC. Protrombinový čas (PT) a D-dimer jsou užitečnými indikátory prognózy a závažnosti onemocnění u COVID-19.

## CÍLE

Naším cílem bylo zjistit, zda zvýšené hladiny D-dimeru předpovídají špatný

vývoj onemocnění COVID-19 a koreluje s úmrtností.

## METODY

Ve studii u 163 koronavirových pneumonií byly před hospitalizací postupně měřeny PT, APTT, fibrinogen, antitrombin, FDP a D-dimer.

## VÝSLEDKY

Celková úmrtnost v souboru byla 6,7 %. Pacienti, kteří zemřeli na následky virové infekce měli významně řádově vyšší hladiny D-dimeru a FDP a současně delší PT a APTT. U pacientů s úmrtím na infekci během hospitalizace byla pozorována progredující konzumpční koagulopatie ve smyslu zvýšení hladin D-dimeru, FDP a výrazného snižování hladiny AT a FIB přes antikoagulační léčbu LMWH.

Kromě toho bylo u několika kriticky nemocných pacientů hlášeno, že u nich došlo ke koagulopatii, vývoji antifosfolipidových protilátek a zvýšenému riziku výskytu arteriálních a žilních trombotických příhod.

## ZÁVĚRY

D-dimer se jeví jako vhodné vyšetření pro triážování závažnosti průběhu infekce COVID-19. Výrazné zvýšení D-dimeru může být běžné u pacientů se závažnými

formami onemocnění COVID-19 stejně jako u jiných závažných infekcí. Jejich pečlivé hodnocení a monitorování by mohlo účinně předpovědět úmrtnost u pacientů s COVID-19 už v rané fázi onemocnění, což pomůže klinikům přizpůsobit léčebný přístup a okamžitě poskytnout intenzivní péči těm, kteří to potřebují nejvíce.

## Grantová podpora

Podpořeno grantem LF-2021-001 a MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892).

# Průkaz HIT u pacientů s COVID-19

**Kmentová K.**

*Centrální hematologická laboratoř, VFN v Praze*

## ÚVOD

Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) může být závažnou komplikací u COVID-19 pozitivních pacientů léčených nefrakcionovaným heparinem (UFH) či nízkomolekulárními hepariny (LMWH). Je navozena aktivací destiček, monocytů a endotelu protilátkami proti komplexu destičkového faktoru 4 (PF4) s hepariny.

Pacienti s HIT jsou ohroženi vznikem trombocytopenie, žilní a/nebo tepenné trombózy, popř. poruchou mikrocirkulace. Všechny tyto aspekty mohou vést ke stavům ohrožujícím život pacienta.

## CÍL

Cílem práce je seznámení s laboratorní problematikou vyšetření HIT a porovnání laboratorních vyšetření, která jsou dnes k dispozici.

## METODIKA

Diagnózu HIT nelze určit bez laboratorních testů. Diagnostika spočívá v:

- detekci na přítomnost protilátek HIT navázaných na komplex PF4/heparin – test PaGIA (particle gel immunoassay), DiaMed;
- detekci na heparinu závislé aktivaci krevních destiček pacientovým sérem (obsahujícím HIT protilátky) – funkční test HITAlert, IQProducts.

## VÝSLEDKY

Ve studii bylo vyšetřeno 436 pacientských vzorků. Z 335 vyšetřovaných vzorků testy HITAlert a PaGIA bylo 320 negativních, jedná se tedy o shodu 95,5 %. Ze 101 vyšetřovaných vzorků testy HITAlert a PaGIA bylo 33 pozitivních, jedná se tedy o shodu 32,7 %.

Časová náročnost na provedení testu je v případě PaGIA kratší než u testu HITAlert, a proto jej můžeme použít jako test první volby – statimový. V případě pozitivního výsledku musíme informovat lékaře o nutnosti vysazení heparinů, popřípadě o jejich nahrazení jiným dostupným antiko-

gulanciem. HITAlert test lze následně použít na potvrzení či vyloučení podezření na heparinem indukovanou trombocytopenii.

## ZÁVĚR

Diagnostika HIT se stále opírá především o klinické údaje. Při podezření na HIT je nutné okamžitě ukončit terapii hepariny. Při klinickém podezření na HIT by lékař měl použít některý ze skórovacích systémů, např. 4Ts. Tuto diagnózu je nutné potvrdit anebo vyloučit laboratorním testováním. Vždy by se k celkovému laboratornímu vyšetření a k potvrzení či vyloučení diagnózy HIT měly používat oba typy testů, tedy jak imunologický, tak funkční.

## Grantová podpora

Studie byla podpořena RVO-VFN64165/2020

## Kazuistika pacienta s koagulopatií

Šibová M., Sadílek P., Ivanová E., Fátorová I.

IV. interní hematologická klinika – laboratoř, FN Hradec Králové

Koagulopatie jsou skupinou onemocnění hemostázy, charakterizované sníženou koncentrací nebo funkční aktivitou jednoho či více koagulačních faktorů nebo von Willebrandova faktoru. Jedná se o vrozená či získaná krvácivá onemocnění. Stupeň krvácení závisí na poklesu koagulační aktivity jednotlivých faktorů. Při výrazném poklesu dochází k těžkým krvácivým projevům nebo až ke spontánnímu krvácení. Lehké defekty se často projeví při chirurgickém zákroku nebo poranění. Léčba je substituční, podávají se krevní deriváty nebo rekombinantní koagulační faktory.

Mezi vrozené koagulopatie řadíme hemofilie A a B a von Willebrandovu chorobu. Vrozené defekty ostatních koagulačních faktorů jsou vzácné. Hemofilie A je způsobena nedostatkem či funkční

poruchou koagulačního faktoru VIII, hemofilie B deficitem či defektem koagulačního faktoru IX. Dědičnost je u obou těchto chorob gonozomálně recesivní, vázaná na pohlavní chromozom X. Ženy jsou přenašečkami, muži nemocní. Laboratorní diagnostika hemofilí spočívá v nález prodlouženého aPTT a v prokázání snížené funkční aktivity koagulačního faktoru VIII, resp. IX. Potenciálním rizikem podávání substituční léčby je tvorba aloprotilátky (specifického inhibitoru). V tomto případě nedochází ke korekci ve směsných testech. Inhibitor lze kvantifikovat Bethesda metodou, příp. Nijmegenovou modifikací. Von Willebrandova choroba je způsobena sníženým množstvím antigenu či poruchou funkce von Willebrandova faktoru. Vzhledem k jeho úloze v hemostáze může být narušena primární hemostáza

i sekundární koagulace. Rozlišujeme 3 typy von Willebrandovy choroby (I, II, III), typ II se dále dělí na 4 podtypy (A, B, M a N). Laboratorní diagnostika je založena na stanovení antigenu von Willebrandova faktoru, stanovení jeho funkce (ristocetinový kofaktor), agregaci destiček po přidavku ristocetinu (RIPA), stanovení multimerů vWF elektroforézou a vazebných kapacit pro faktor VIII a pro kolagen.

Získaná forma hemofilie nebo von Willebrandovy choroby souvisí nejčastěji s tvorbou specifických protilátek. Další příčinou může být porucha jaterních funkcí, porucha resorpce a využití vitamínu K či syndrom diseminované intravaskulární koagulace.

Prezentovat budeme kazuistiku pacienta s koagulopatií, která byla řešena na našem pracovišti.

# Rejstřík jmen

- A**  
 Adam Z. .... S158  
 Antošová M. .... S204
- B**  
 Bátorová A. .... S10  
 Beličková M. .... S71  
 Beran O. .... S182  
 Beránek M. .... S8  
 Bhuiyanová Ludvíková Z. .... S184, S189  
 Bláha M. .... S187  
 Blahutová Š. .... S190  
 Blažek B. .... S203  
 Böhmová M. .... S184, S189  
 Bohoněk M. .... S179  
 Bolcková H. T. .... S191  
 Brillantová M. .... S46, S203  
 Brychtová Y. .... S69  
 Buliková A. .... S42  
 Burgerová P. .... S204
- C**  
 Campr V. .... S41  
 Cetkovský P. .... S150
- Č**  
 Čermák J. .... S106, S128  
 Čermáková Z. .... S190  
 Červinek L. .... S116, S164  
 Čuřík N. .... S78
- D**  
 Doubek M. .... S61, S69, S104, S166  
 Drgoňa L. .... S135  
 Dulíček P. .... S8, S20
- F**  
 Fátorová I. .... S206  
 Folber F. .... S87, S142, S147  
 Froňková E. .... S123
- G**  
 Gašová Z. .... S184, S189  
 Gumulec J. .... S20, S161, S175
- H**  
 Hájek R. .... S28, S46  
 Horáková R. .... S203
- Hrachovinová I. .... S49, S68  
 Hrdličková R. .... S190  
 Husáková M. .... S48
- CH**  
 Chalupníková P. .... S204
- I**  
 Ivanová E. .... S8, S206
- J**  
 Janíková A. .... S35  
 Janírková V. .... S203  
 Jelínek T. .... S31  
 Jindra P. .... S145  
 Jonášová A. .... S118
- K**  
 Kalina T. .... S68  
 Kanderová V. .... S68  
 Kaščák M. .... S156  
 Kissová J. .... S204  
 Kmentová K. .... S205  
 Komrská V. .... S14  
 Kořen J. .... S94  
 Kotašková J. .... S69  
 Kouba M. .... S133  
 Kovářová Kudrnová Z. .... S7  
 Kozák T. .... S152, S169  
 Krejčí M. .... S147  
 Kriegová E. .... S101  
 Kubričanová Žaliová M. .... S62  
 Kunt-Vonková B. .... S69  
 Kupková P. .... S204  
 Kvasnička J. .... S48  
 Kvasnička T. .... S6
- L**  
 Lánská M. .... S187  
 Lysák D. .... S84, S139
- M**  
 Machová Poláková K. .... S56  
 Maisnar V. .... S24  
 Malčíková J. .... S69  
 Malíková I. .... S48  
 Mašlejová S. .... S69  
 Matýšková M. .... S54

Mayer J. ....	S69
Miarková E. ....	S192
Mikešová M. ....	S47
Mikulenková D. ....	S41, S203
Minařík J. ....	S26
Mráz M. ....	S98

**N**

Němcová L. ....	S69
Neplechová D. ....	S204

**P**

Panovská A. ....	S69
Papajík T. ....	S101
Pavlová Š. ....	S69
Pecherková P. ....	S189
Penka M. ....	S204
Pika T. ....	S155
Písačka M. ....	S196
Plevová K. ....	S69
Polgárová K. ....	S90, S142
Pospíšilová D. ....	S75, S124
Pospíšilová Š. ....	S69
Procházka V. ....	S34
Procházková R. ....	S194, S201
Pulcer M. ....	S47, S203
Pytlík R. ....	S142

**R**

Ráčil Z. ....	S172
---------------	------

**Ř**

Řehořová L. ....	S194
------------------	------

**S**

Sadílek P. ....	S8, S206
Schwarz J. ....	S58
Sečkařová M. ....	S204
Sedlák P. ....	S202
Slavík L. ....	S204
Slouková M. ....	S184, S189
Smejkal P. ....	S16
Souček O. ....	S45

Starý J. ....	S62
Stránská K. ....	S69
Suková M. ....	S111
Szotkowski T. ....	S137

**Š**

Šálek C. ....	S61
Šibová M. ....	S206
Šigutová P. ....	S51
Šimečková R. ....	S45
Škvárová Kramaržová K. ....	S81
Šrámek J. ....	S142
Šrámek V. ....	S172
Šrámková L. ....	S142

**T**

Thibaud Z. ....	S8
Trněný M. ....	S90

**U**

Úlehlová J. ....	S204
Urbánková H. ....	S101

**V**

Vacková B. ....	S184
Včelková A. ....	S203
Vranovský A. ....	S38

**Y**

Yazer M. ....	S200
---------------	------

**Z**

Zápotocká E. ....	S14
Zatloukalová L. ....	S204
Závacká K. ....	S69
Zavřelová J. ....	S52
Zdražilová H. ....	S204
Zmeškalová D. ....	S203
Zuchnická J. ....	S46
Zuna J. ....	S57

**Ž**

Žák P. ....	S66, S135, S172, S187
-------------	-----------------------





# Transfuze a hematologie *dnes*

## VEDOUcí REDAKTOR

**prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.**

Hemato-onkologická klinika FN Olomouc  
edgar.faber@fnol.cz

## REDAKCE

### ZA SPOLEČNOST PRO TRANFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

**MUDr. Renata Procházková, Ph.D.**

Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice,  
Liberec

**MUDr. Petr Turek, CSc.**

Transfuzní oddělení, Thomayerova nemocnice,  
Praha

### ZA ČESKOU HEMATOLOGICKOU SPOLEČNOST

**doc. MUDr. Jan Blatný, Ph.D.**

Oddělení dětské hematologie, FN Brno

**doc. MUDr. Ľuboš Drgoňa, CSc.**

Klinika onkohematologie, Národní  
onkologický ústav, Bratislava

**MUDr. Zdeněk Kořístek, Ph.D.**

Klinika hematoonkologie FN Ostrava

**prof. MUDr. Marta Krejčí, Ph.D.**

Interní hematologická a onkologická klinika  
FN Brno

**doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.**

Hematoonkologické oddělení, FN Plzeň

**doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.**

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

**MUDr. Martin Šimkovič, Ph.D.**

IV. interní hematologická klinika  
FN Hradec Králové

## REDAKČNÍ RADA

### ZA SPOLEČNOST PRO TRANFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

**plk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.**

Oddělení hematologie a krevní transfuze,  
ÚVN – VFN Praha

**MUDr. Dana Galuszková, Ph.D., MBA**

Transfuzní oddělení, FN Olomouc

**doc. MUDr. Zdenka Gašová, Ph.D.**

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

**MUDr. Hana Lejdarová**

Transfuzní a tkáňové oddělení, FN Brno

**MUDr. Jiří Masopust**

Transfuzní oddělení, Krajská zdravotní a.s. –  
Masarykova nemocnice Ústí nad Labem, o.z.

**MUDr. Martin Písačka**

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

**MUDr. Vít Řeháček**

Transfuzní oddělení, FN Hradec Králové

### ZA ČESKOU HEMATOLOGICKOU SPOLEČNOST

**prof. MUDr. Angelika Bátorová, CSc.**

Klinika hematologie a transfúziologie,  
Univerzitná nemocnica  
Bratislava

**prof. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc.**

Ústav hematologie a krevní transfuze,  
Praha

**prof. MUDr. Tomáš Kozák, Ph.D., MBA**

Interní hematologická klinika  
FN Královské Vinohrady,  
Praha

**prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc.**

Interní hematologická a onkologická klinika  
FN Brno

**prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.**

Hemato-onkologická klinika  
FN Olomouc

**prof. MUDr. Jan Starý, CSc.**

Klinika dětské hematologie a onkologie  
FN Motol, Praha

**prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.**

I. interní klinika – klinika hematologie  
VFN v Praze

**prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.**

IV. interní hematologická klinika  
FN Hradec Králové

© Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, Praha 2021

## Transfuze a hematologie dnes

**Vydavatel:** Česká lékařská společnost  
Jana Evangelisty Purkyně, z. s., Sokolská 31,  
120 26 Praha 2

**Nakladatel:** Care Comm s.r.o.,  
Klicperova 604/8, 150 00 Praha 5

### Vedoucí redaktor:

prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.

### Odpovědný redaktor:

Mgr. Lucie Simonidesová

**Grafická úprava:** Karel Zlevor

### Jazyková korektura:

Bc. Eliška Škorpíková

Vychází 4x ročně.

Předplatné na rok pro ČR je 550 Kč + poštovné  
a pro SK je 26 € + poštovné

Objednávka předplatného ČR na adrese:  
předplatne@carecomm.cz

On-line verze časopisu je přístupná na adrese  
<https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuze-hematologie-dnes>.

### Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá:

Jan Laitl, e-mail: [jan.laitl@carecomm.cz](mailto:jan.laitl@carecomm.cz),  
+420 725 778 001.

Rukopisy nahrávejte přes redakční  
systém Open Journal System na adrese  
<https://redakce.carecomm.cz/tahd/>.  
Zaslané příspěvky se nevracejí.

Vydavatel získá otištěním příspěvku výlučné  
nakladatelské právo k jeho užití.

Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány,  
autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu.  
Vydavatel a redakční rada upozorňují, že  
za obsah a jazykové zpracování inzerátů  
a reklam odpovídá výhradně inzerent. Žádná  
část tohoto časopisu nesmí být kopírována  
a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování  
v jakékoli formě či jakýmkoli způsobem, ať již  
mechanickým nebo elektronickým, včetně  
pořizování fotokopii, nahrávek, informačních  
databází na magnetických nosičích bez  
písemného souhlasu vlastníka autorských práv  
a vydavatelského oprávnění.

Toto číslo vychází 12. 9. 2021



