

Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results

Hughes T., Deininger M., Hochhaus A. et al., Blood 108, 2006; 28-37.

Úvod: Zavedení imatinib mesylátu (IM) do terapie pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v roce 1998 mělo za následek revoluční změnu v přístupu k této chorobě. Druhá generace inhibitorů tyrosin kinázy může prokázat ještě lepší účinek než IM. Metoda tzv. real-time kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RQ-PCR) umožňuje přesné měření celkového počtu leukemických buněk a míra poklesu BCR-ABL transkriptů během terapie koreluje s přežitím bez příznaků nemoci (PFS, progression-free survival). Jelikož je rostoucí hladina BCR-ABL časným ukazatelem ztráty terapeutické odpovědi a tedy ukazatelem potřeby změny léčebné strategie, je pravidelné monitorování pacientů více než žádoucí. V tomto článku autoři shrnují výsledky vplynuvší ze setkání v National Institute of Health v Bethesdě v říjnu roku 2005. Jsou zde uvedeny návrhy na:

- (1) sjednocení lišících se metodik měření BCR-ABL transkriptů u pacientů s CML podstupujících léčbu a používání převodního koeficientu, díky kterému by každá laboratoř mohla vyjadřovat hladinu BCR-ABL transkriptů na mezinárodně uznávané škále;
- (2) užívání série RQ-PCR výsledků ke sledování pacientů reagujících na léčbu spíše než klasického cytogenetického vyšetření nebo fluorescenční hybridizace in situ (FISH) genu BCR-ABL z kostní dřeně;
- (3) detekci a způsob vyjadřování subpopulací buněk s Filadelfským (Ph) chromosomem nesoucích mutaci v BCR-ABL kinásové doméně.

Shrnutí doporučení:

- Ad bod 1:

Autoři se snažili shrnout různé přístupy a vyslovit doporučení, která by do budoucna mohla vést ke **standardizaci postupů sledování hladiny BCR-ABL transkriptů** u pacientů s CML. Dle autorů lze mezinárodní standardizace docílit výměnou referenčních hodnot pečlivě stanovených v referenčních laboratořích. Tyto stanoví reprodukovatelnost každé metody a ukáží na techniky, které nejsou vhodné k přesnému stanovení hladiny BCR-ABL. Referenční vzorky a vzorky kontrolující kvalitu připravované ve velkém množství komerční firmou nebo národně podporovanou laboratoří považují autoři za žádoucí a měly by být dle jejich názoru zavedeny do metodik, jakmile budou k dispozici. Osvědčily se již například při stanovování množství kopií viru HCV nebo HIV v krvi při sledování úspěšnosti léčby těchto onemocnění. Pro analýzu a monitoraci hladiny BCR-ABL transkriptů u pacientů s CML v chronické fázi byla **doporučena periferní krev**. Důraz byl kladen na **rychlý transport vzorků** do laboratoře a jejich včasné zpracování (do 24 hod. max. 36 hod od sběru), aby bylo minimalizováno riziko degradace RNA. Autoři doporučují odběr 10ml periferní krve do EDTA zkumavky. Minimální množství jaderných buněk pro analýzu je $1-2 \times 10^7$. Autoři dále zdůrazňují nutnost pečlivé monitorace metod extrakce RNA a reverzní transkripce, prevence kontaminace vzorků v laboratoři a správného průběhu PCR. Přesnější metodické informace jsou obsaženy v publikaci autorů Hughes TP, Branford S. Monitoring disease response ⁽¹⁾, zdůvodnění a podložení těchto doporučení byla publikována samostatně (v době publikace tohoto článku ještě nebyla publikována): S.B., N.C.P.C., A.H., J.R., G.S., J.K., J.G., T.H.;

„Harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts by real-time quantitative PCR: specific recommendations and rationale“. Tři specifické kontrolní geny, ABL, BCR nebo β -glukuronidasa (GUSB) byly odsouhlaseny jako vhodné a laboratoře zahajující metodu detekce BCR-ABL by si měly jeden z nich vybrat. **Výsledky** každého pacienta by měly být vyjádřeny **v procentech vyjadřujících poměr počtu BCR-ABL kopií k počtu kopií kontrolního genu**. Významný byl návrh, dle kterého by si jednotlivé laboratoře mohly odvodit **převodní koeficient**, který by umožnil převést jejich vlastní výsledky do mezinárodní škály. Tato mezinárodní škála navrhovaná autory by byla založena na dvou hodnotách, standardizovaná základní hodnota zavedena v IRIS studii by zde reprezentovala 100% a její 3-log snížení, tj. hodnota **velké molekulární odpovědi (MMoIR), by tedy byla 0,1%**. Převodní koeficient by byl odvozen z hodnoty, která odpovídá MMoIR, a měl by být otestován sérií vzorků kontrolujících kvalitu s hodnotami stanovenými v referenčních laboratořích. Význam hodnoty BCR-ABL by měl být vždy zvažován v kontextu s léčbou a předchozí sérií výsledků.

- *Ad bod 2:*

Autoři doporučují **vyšetřit hladinu BCR-ABL transkriptů** v periferní krvi a cytogenetické vyšetření kostní dřeně **před zahájením léčby** u každého pacienta s nově diagnostikovanou CML v chronické fázi. Cytogenetické vyšetření kostní dřeně je podstatné k eventuálnímu nalezení neobvyklých translokací nebo přídatných cytogenetických abnormalit. RQ-PCR BCR-ABL v době diagnózy umožňuje zjistit, zda jsou přítomny běžné transkripty e13a2 (b3a2) nebo e14a2 (b3a2) nebo méně obvyklé fúzní transkripty, které nejsou amplifikovány standardními sety primerů. **Po zahájení léčby** inhibitory tyrosin kinázy u pacientů odpovídajících na léčbu je doporučeno sledovat hladinu BCR-ABL transkriptů v periferní krvi **v tříměsíčních intervalech**. U pacienta, který dobře reaguje na zavedenou léčbu, je možno vynechat cytogenetické vyšetření kostní dřeně po třech měsících terapie a provést ho až po šesti měsících k potvrzení Ph negativity. V okamžiku, **kdy pacient dosáhne kompletní cytogenetické remise (CCyR)**, je doporučeno sledovat hladinu BCR-ABL transkriptů **v minimálně tříměsíčních intervalech**. Pokud by došlo ke zvýšení hladiny transkriptů, mělo by sledování hladiny pokračovat v intervalech kratších tří měsíců. U pacienta v CCyR by se mohlo zredukovat rutinní cytogenetické vyšetření kostní dřeně na každých dvanáct měsíců. FISH vyšetření periferní krve není pro svou nízkou sensitivitu v porovnání s RQ-PCR považováno za vhodné ke sledování pacientů v CCyR. **Při rostoucí hladině BCR-ABL transkriptů** během léčby je po překročení určité hranice vzestupu namíste **provedení mutační analýzy** kinasové domény. Tato hranice zatím není jasně stanovena. Někteří autoři (skupina z Adelaide) uvádějí silnou asociaci s **dvounásobným vzestupem** a detekcí mutací, jiní za indikaci k provedení mutační analýzy považují **pětinásobný vzestup hladiny BCR-ABL transkriptů** potvrzený více než jedním testem. Rostoucí hladina BCR-ABL transkriptů je s větší pravděpodobností spojená s mutacemi v kinasové doméně u pacientů, kteří nikdy nedosáhli MMoIR.

- *Ad bod 3:*

Dle autorů by měla být **mutace kinasové domény (KD)** hledána **u každého pacienta v pokročilém stádiu** onemocnění CML. Toto vyšetření by se mělo opakovat, pokud tito pacienti neodpovídají na léčbu inhibitory tyrosin kinázy nebo při rostoucí hladině BCR-ABL transkriptů u pacientů, kteří zatím měli dobrou odpověď na léčbu. U pacientů **v chronické fázi CML** je skrínink mutací KD indikován **v případě nedostatečné počáteční odpovědi nebo u jakéhokoliv náznaku ztráty odpovědi**. Minimálně by tato kritéria zahrnovala pacienty, kteří **nedosáhli** kompletní hematologické remise (CHR) **po**

3 měsících léčby, minimální cytogenetické odpovědi po 6 měsících léčby nebo velké cytogenetické odpovědi po 12 měsících léčby. Ztráta odpovědi na léčbu je v článku provizorně definována jako **hematologický relaps, relaps z CCyR do Ph pozitivity nebo vzestup BCR-ABL transkriptů o 1 log, tj. 10x nebo více.** Je doporučeno vyjadřovat jednotlivé mutace v terminologii, která ukáže jak záměnu aminokyselin, tak nukleotidů. Bylo by také žádoucí uvádět poměr množství mutovaných transkriptů k nemutovaným. V tabulce navržené autory na vyjadřování výsledků mutační analýzy je také údaj, zda se mutace nalézá uvnitř nebo vně P-kličky, protože každá z nich může být spojena s jinou prognózou. Ačkoliv se původně předpokládalo, že nález jakékoliv mutace KD u pacienta znamená rezistenci na imatinib a předpovídá progresi onemocnění, ukázalo se postupně, že různé mutace souvisí s různou mírou rezistence, z nichž některé mohou být překonány navýšením dávky imatinibu nebo užitím jednoho z preparátů inhibitorů tyrosin kinázy druhé generace. Zatím jen mutace T315I způsobuje úplnou rezistenci na všechny klinicky dostupné inhibitory BCR-ABL. Naopak některé malé klony u pacientů před zahájením léčby imatinibem a jiné malé klony u pacientů na léčbě imatinibem nemusí být nutně klinicky významné. Proto snad není nutné rutinně detekovat mutantní klony menší než 20% všech Ph pozitivních transkriptů. Pro tuto potřebu je **přímé sekvenování** dostatečně citlivé a **je v současnosti metodou volby.**

Závěr: Autoři článku si jsou vědomi, že doporučení jsou založena na nekompletních klinických datech, která vycházejí z velmi rychle se vyvíjející oblasti, a že jsou tudíž dočasná a budou potřebovat revizi s každými novými poznatky.

(1) Hughes TP, Brandford S. Monitoring disease response. V: Melo JV, Goldman JM, eds. Myeloproliferative disorders. Berlin, Germany: Springer Verlag; 2006.

Zpracovala: MUDr. Markéta Vyskočilová a MUDr. Daniela Žáčková, Interní hematoonkologická klinika FN Brno