
**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni**



DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Prognostický význam molekulárních markerů akutní myeloidní leukémie
na výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk**

Autor: MUDr. Michal Karas

Plzeň 2016

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni
Katedra vnitřního lékařství



DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Prognostický význam molekulárních markerů akutní myeloidní
leukémie na výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk**

Dizertační práce doktorandského studia

Obor: vnitřní nemoci

Autor: MUDr. Michal Karas

Školitel: doc. MUDr. Luboš Holubec, Ph.D.

Plzeň, 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci na téma „Prognostický význam molekulárních markerů akutní myeloidní leukémie na výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk“ zpracoval samostatně, pod vedením doc.MUDr.Luboše Holubce, PhD. Veškeré použité literární zdroje a informace jsou uvedeny v seznamu bibliografických odkazů.

V Plzni, 2016

Poděkování

Děkuji doc. MUDr. Luboši Holubcovi, Ph.D. za vedení, odbornou pomoc, cenné rady, připomínky a vstřícný přístup při vedení a konzultacích mé dizertační práce.

V Plzni, 2016

Abstrakt

V dizertační práci “ Prognostický význam molekulárních markerů akutní myeloidní leukémie na výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk ” autor řeší následující problematiku:

1. **V literárním přehledu charakterizuje:** epidemiologii, patogenezu, diagnostiku, prognózu a léčbu akutní myeloidní leukémie se zaměřením na zhodnocení různých prognostických markerů ve vztahu ke léčbě akutní myeloidní leukémie především pomocí alogenní transplantace krvetvorných buněk.
2. **V metodické části jsou charakterizovány:**
 - a) Soubor nemocných a použité klinické hodnocení :
 - Detailní charakteristika 60 pacientů s akutní myeloidní leukémií s normálním karyotypem a mutací NPM1 genu v kompletní remisi, kteří podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných buněk na Hematologicko-onkologickém oddělení FN Plzeň v letech 2005-2014. Součástí charakteristiky je i zhodnocení dalších parametrů základního onemocnění a detailní popis transplantačních postupů (výběr dárce, typ předtransplantační přípravy atd.).
 - b) Období a způsob odběru materiálu ke stanovení hladiny minimální reziduální nemoci před transplantací. Popis metody způsobu detekce hladiny minimální reziduální nemoci na základě detekce relativní exprese mutovaného NPM1 genu pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce.
 - c) Použité statistické metody zpracování.
3. **Ve výsledkové části autor prokázal, že:**
 - a) Hladina minimální reziduální nemoci u pacientů s akutní myeloidní leukémií v kompletní remisi se liší v době těsně před zahájením předtransplantační přípravy.
 - b) Hladina minimální reziduální nemoci u pacientů s akutní myeloidní leukémií v době před alogenní transplantací krvetvorných buněk statisticky signifikantně ovlivňuje transplantační výsledky.
4. **Součástí práce je literární přehled obsahující 341 literárních citací a přehled publikovaných prací autora na dané téma.**

Klíčová slova: akutní myeloidní leukémie, NPM1 mutace, minimální reziduální nemoc, alogenní transplantace krvetvorných buněk

Abstract

In this thesis entitled "The prognostic significance of molecular markers of acute myeloid leukemia on the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation" the author deals with the following issues:

- 1. In the literature overview:** the author characterizes the epidemiology, pathogenesis, diagnostics, prognosis and treatment of acute myeloid leukemia, focusing on evaluation of different prognostic markers in relation to the treatment of acute myeloid leukemia mainly using allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

- 1. The methodological section characterizes the following:**
 - a) Groups of patients and methods of clinical evaluation in:
 - Detailed characteristics of 60 patients with acute myeloid leukemia with normal karyotype and NPM1 gene mutations in complete remission who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation on Haematology and oncology department of University Hospital Pilsen in the years 2005-2014. The evaluation of other parameters of the underlying disease, and a detailed description of transplant procedure (donor selection, the type of pre-transplantation preparation etc.) is also part of characteristics.
 - b) The timing and method of sampling for evaluation of the level of minimal residual disease before transplantation. Description of the method for detection of the level of minimal residual using assessment of the relative expression of mutated NPM1 gene by quantitative polymerase chain reaction.
 - c) The statistical parameters and methods employed

- 3. In the final section the author demonstrates that:**
 - a) The level of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia in complete remission vary before the start of pretransplantation conditioning regimen.
 - b) The level of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation statistically significantly affects the transplant results.

- 4. The thesis provides an overview of relevant literature which includes 341 sources and overview of author's own publications on this particular field.**

Key words: acute myeloid leukemia, NPM1 mutation, minimal residual disease, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Obsah:

<u>SEZNAM VYBRANÝCH ZKRATEK.....</u>	<u>9</u>
<u>1.ÚVOD.....</u>	<u>10</u>
<u>2.SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....</u>	<u>11</u>
2.1 DEFINICE A EPIDEMIOLOGIE	11
2.2 ETIOLOGIE A PATOGENEZA	12
2.2.1 RIZIKOVÉ FAKTORY	12
2.2.2 GENETICKÝ MODEL ROZVOJE AML	14
2.3 KLASIFIKACE	16
2.3.1 WHO KLASIFIKACE	16
2.4 KLINICKÝ OBRAZ	18
2.5 DIAGNOSTICKÉ METODY	19
2.5.1 KREVŇÍ OBRAZ	19
2.5.2 MORFOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ KOSTNÍ DŘENĚ	19
2.5.3 IMUNOFENOTYPIZACE	20
2.5.4 CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ	20
2.5.5 MOLEKULÁRNĚ-CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ	21
2.5.6 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ VYŠETŘENÍ	22
2.5.7 DALŠÍ VYŠETŘENÍ A POSTUPY V INICIÁLNÍ DIAGNOSTICE AML	22
2.6 PROGNÓZA	23
2.6.1 PROGNOSTICKÉ FAKTORY SOUVISEJÍCÍ S PACIENTEM	23
2.6.2 PROGNOSTICKÉ FAKTORY SOUVISEJÍCÍ S AML	26
2.7 LÉČBA AML	42
2.7.1 HODNOCENÍ LÉČEBNÉ ODPOVĚDI	42
2.7.2 KURATIVNÍ CYTOSTATICKÁ LÉČBA	43
2.7.3 PALIATIVNÍ LÉČBA AML	50
2.7.4 TRANSPLANTACE KRVĚTVORNÝCH BUNĚK	50
2.7.5 NOVÉ LÉČEBNÉ POSTUPY	67
<u>3.CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE.....</u>	<u>70</u>
3.1 ÚVOD	70
<u>4.PACIENTI A METODIKA.....</u>	<u>76</u>
4.1 SOUBOR PACIENTŮ	76
4.2 METODIKA MONITORACE MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI	76

4.3 STATISTICKÁ ANALÝZA	77
<u>5.VÝSLEDKY.....</u>	<u>78</u>
5.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ	78
5.2 CELKOVÉ VÝSLEDKY TRANSPLANTOVANÉHO SOUBORU	79
5.3 VÝZNAM VSTUPNÍCH PROGNOTICKÝCH MARKERŮ	81
5.4 VÝZNAM VSTUPNÍ HLADINY MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI	83
<u>6.DISKUZE.....</u>	<u>87</u>
<u>7.ZÁVĚR.....</u>	<u>92</u>
<u>8.POUŽITÁ LITERATURA.....</u>	<u>93</u>
<u>9.PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA.....</u>	<u>122</u>
9.1 PUBLIKACE	
9.2 ABSTRAKTA PŘEDNÁŠEK A POSTERŮ PUBLIKOVANÁ V PERIODICÍCH	

Seznam vybraných zkratek

- ***AloTx*** alogenní transplantace
- ***AML*** akutní myeloidní leukémie
- ***APL*** akutní promyelocytární leukémie
- ***ATG*** antithymocytární globulin
- ***CIBMTR*** Center for international blood and marrow transplant research
- ***CMV*** cytomegalovirus
- ***CNS*** centrální nervový systém
- ***CT*** počítačová tomografie
- ***DLI*** infúze dárcovský lymfocytů
- ***DNA*** deoxyribonukleová kyselina
- ***EBMT*** European Society for Blood and Marrow Transplantation
- ***EFS*** přežití bez události – event free survival
- ***GIT*** gastrointestinální trakt
- ***GVHD*** nemoc z reakce štěpu proti hostiteli – graft versus host disease

- ***HLA*** hlavní histokompatibilní komplex – human leukocyte antigen
- ***IgVH*** těžký řetězec imunoglobulinu
- ***KR*** kompletní remise
- ***LDH*** laktátdehydrogenáza
- ***MDS*** myelodysplastický syndrom
- ***MFCM*** multiparametrová průtoková cytometrie
- ***miRNA*** mikroRNA
- ***MPN*** myeloproliferativní onemocnění
- ***MR*** magnetická rezonance
- ***MRN*** minimální reziduální nemoc
- ***NPM1*** nukleophosmin 1
- ***OS*** celkové přežití - overall survival
- ***p*** statistická významnost
- ***PR*** parciální remise
- ***PCR*** polymerázová řetězová reakce
- ***RNA*** ribonukleová kyselina
- ***RT-PCR*** kvantitativní polymerázová řetězová reakce
- ***WHO*** Světová zdravotnická organizace

1. Úvod

Dizertační práce na téma „**Prognostický význam molekulárních markerů akutní myeloidní leukémie na výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk**“ je rozčleněna do následujících kapitol:

- V úvodní kapitole „**Přehled současného stavu problematiky**“ je základní přehled epidemiologie, etiologie, patogenezy, klasifikace, diagnostiky, prognózy a léčby akutní myeloidní leukémie. Pozornost je pak zaměřena na význam prognostických markerů ovlivňujících výsledek léčby akutní myeloidní leukémie a výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk, a to především na oblast molekulárně genetických markerů a význam minimální reziduální nemoci.
- V kapitole „**Cíl dizertační práce**“ je definován důvod a cíl dizertační práce, kterým ověřit a zhodnotit potenciální prognostický význam stanovení hladiny minimální reziduální nemoci před alogenní transplantací krvetvorných buněk u pacientů v kompletní remisi akutní myeloidní leukémie na výsledek transplantační léčby.
- V kapitole „**Pacienti a metodika**“ je charakterizována sledovaná skupina nemocných. Je zde popsán způsob klinického vyhodnocení, metodika stanovení molekulárních markerů a statistické zpracování výsledků.
- V kapitole „**Výsledky**“ jsou analyzovány výsledky získané během sledování v letech 2005 - 2014.
- V kapitole „**Diskuze**“ jsou námi dosažené výsledky srovnávány s literárními údaji a je zde diskutován potenciální význam využití stanovení molekulárních markerů akutní myeloidní leukémie v rámci hodnocení přítomnosti reziduální nemoci a její vliv na výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk.
- V kapitole „**Závěr**“ jsou shrnuty základní zjištěná fakta

2. Současný stav problematiky

2.1 Definice a epidemiologie

Akutní myeloidní leukémie (AML) představuje klinicky, morfologicky, imunologicky a geneticky heterogenní skupinu onemocnění, kterou charakterizuje klonální proliferace nezralých krvetvorných buněk, jejich akumulace v kostní dřeni a následně v řadě případů jejich vyplavování do periferní krve. AML je definována jako klonální expanze nezralých buněk krvetvorby, jejichž zastoupení představuje > 20% jaderných buněk v kostní dřeni [1,2].

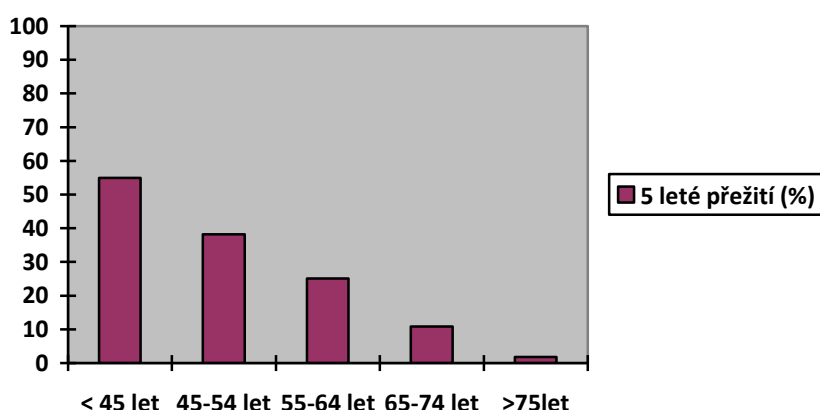
AML patří mezi vzácnější nádorová onemocnění, ale vzhledem ke své biologické podstatě má disproporcionálně velký negativní vliv na statistiky nádorového přežití [3].

AML patří k nejčastějším leukémiím dospělého věku a tvoří 80% z akutních leukémií dospělých. Incidence AML u dospělých v Evropě je 2-4/100000 [1]. Incidence narůstá s věkem. V letech 2006-2010 byla v USA incidence AML u nemocných mladších 65 let 1,8/100000 a u nemocných ve věku 65 let a starších 16,8/100000 [4]. Medián věku při diagnóze je 65 let [5]. AML je mírně častěji diagnostikována u mužů než u žen. V letech 2006-2010 byla v USA celková incidence AML 3,7/100000, u mužů pak 4,5/100000 a u žen 3,1/100000. V posledních 30 letech pak nedochází k významnějšímu vzestupu incidence AML [4]. Celosvětově je nejvyšší incidence AML v USA, Austrálii a Evropě a poněkud nižší incidence v Asii [6].

Mortalita u AML na základě dat z USA byla v letech 2006-2010 2,7/100000. Mortalita narůstá s věkem a mírně častější je u mužů než u žen. 5 leté přežití po stanovení diagnózy AML bylo v letech 2003-2009 v USA celkově 24,9%, což představuje statisticky signifikantní zlepšení ve srovnání s obdobím 1975-1977, kdy bylo 5 leté přežití 6,2% (viz. tabulka 1). Pravděpodobnost 5 letého přežití klesá s věkem pacienta v době diagnózy AML, kdy v USA v období 2003-2009 u nemocných mladších 65 let bylo 5 leté přežití 41,6% a u starších nemocných pak pouze 5,4% (viz. obrázek 1) [4].

Tabulka 1 - 5 leté přežití u AML v závislosti na době diagnózy [4]

Období dg. AML	5 leté přežití (%)
1975-1977	6,2
1978-1980	7,6
1981-1983	8,4
1984-1986	10,6
1987-1989	11,4
1990-1992	13,7
1993-1995	16,2
1996-1998	16,9
1999-2001	19,9
2003-2009	24,9

Obrázek 1 - 5 leté přežití u AML v závislosti na věku v době diagnózy v období 2003-2009 [4]

(pozn. v rámci epidemiologických dat byla převážně využita komplexní data databáze SEER /Surveillance, Epidemiology, and End Results/ v USA, protože aktuální epidemiologická data českého „Národního onkologického registru“ týkající se AML a též hematologických malignit nejsou narozdíl od jiných nádorů k dispozici).

2.2 Etiologie a patogeneze

AML je nemoc, která vzniká maligní transformací kmenové hematopoetické buňky. Ta se diferencuje v myeloidní nebo myelomonocytární blasty, méně často blasty erytroidní či megakaryocytární. Pro buňky AML je typická proliferace a zástava diferenciaci na úrovni blastů. Proliferace blastů vymykající se fyziologické autoregulaci vede k rychlému zvýšení jejich počtu, což vede k útlaku fyziologické krvetvorby a důsledkem tohoto procesu je pokles normálních krvinek v periferní krvi [1].

Samotná etiologie vzniku AML není zcela objasněna, i když jsou známy některé rizikové faktory, které se mohou na rozvoji AML spolupodílet. Současná představa samotné patogeneze AML je postavena na konceptu víceúrovňového rozvoje genetických změn v hematopoetické kmenové buňce, jenž vedou k výše uvedené nekontrolované proliferaci a poruše diferenciaci.

2.2.1 Rizikové faktory

Rozvoj AML je spojen s některými rizikovými faktory, které jsou sumarizovány v tabulce 2. Mezi tyto faktory patří věk, předchozí hematologické onemocnění, vrozená genetická onemocnění, předchozí expozice radiaci, chemoterapii nebo jiným chemikáliím. Diskutovaný je vliv virových infekcí. Nicméně tyto známé rizikové faktory se finálně podílí na vzniku AML jen u menší části případů [2].

Tabulka 2 - Selektované rizikové faktory spojené s AML [2]

Vrozená genetická onemocnění	Downův syndrom Klinefelterův syndrom Patauův syndrom Ataxia teleangiectasia Schwachmanův syndrom Kostmanův syndrom Neurofibromatóza Fanconiho anémie Li-Fraumeniův syndrom
Radiační expozice	Neterapeutické, terapeutické ozáření
Expozice cytostatikům	Alkylační látky Inhibitory topoizomerázy-II Anthracyklíny Taxany
Expozice chemickým látkám	Benzen Pesticidy Nikotinismus Herbicidy Fixační tekutiny (formaldehyd, metanol atd.)

2.2.1.1 Vrozené genetické faktory

U jedinců s některými vrozenými genetickými onemocněními je zvýšené riziko rozvoje AML.

Děti s Downovým syndromem mají 10-20x vyšší pravděpodobnost rozvoje akutní leukémie a podobně je tomu i u Klinefelterova syndromu, Fanconiho anémie, neurofibromatózy atd [8,9].

V některých případech může být určitá genetická predispozice děděna v rámci rasy či etnika, což dokladují například práce týkající se akutní promyelocytární leukémie (APL), která je geneticky spojena s translokací chromozomů 15 a 17, jejímž výsledkem je vznik fúzního genu PML-RAR α . Z dosud neznámých důvodů je vyšší incidence APL u dospělých v Latinské Americe a v jižní Evropě. Především pak v Latinské Americe je prokazováno frekventnější místo zlomu RAR α a to v oblasti intronu 6 (zvaného bcr1). Lze tedy spekulovat, že sklon ke zlomu v této oblasti může být determinován geneticky [10,11].

V poslední době byly též publikovány práce, jenž dokladují, že polymorfismy některých genů, které hrají roli v metabolismu kancerogenů, mohou zvyšovat riziko rozvoje AML. Například NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza 1 (NQO1) je enzym detoxifikující chinony a snižující oxidační stres. Polymorfismus v oblasti nukleotidu 609 genu pro NQO1 vede k nižší aktivitě enzymu. Tato varianta uvedeného genu je spojená s predispozicí k rozvoji s chemoterapií spojené AML a určitými genetickými aberacemi [12,13,14]. Lze předpokládat, že polymorfismy dalších genů, které se podílejí na metabolismu kancerogenů či genů, které ovlivňují imunitní systém mohou hrát roli v predispozici k rozvoji AML.

2.2.1.2 Fyzikální a chemické faktory

Řada fyzikálních a chemických faktorů je pokládána za potenciální faktory zvyšující riziko rozvoje AML.

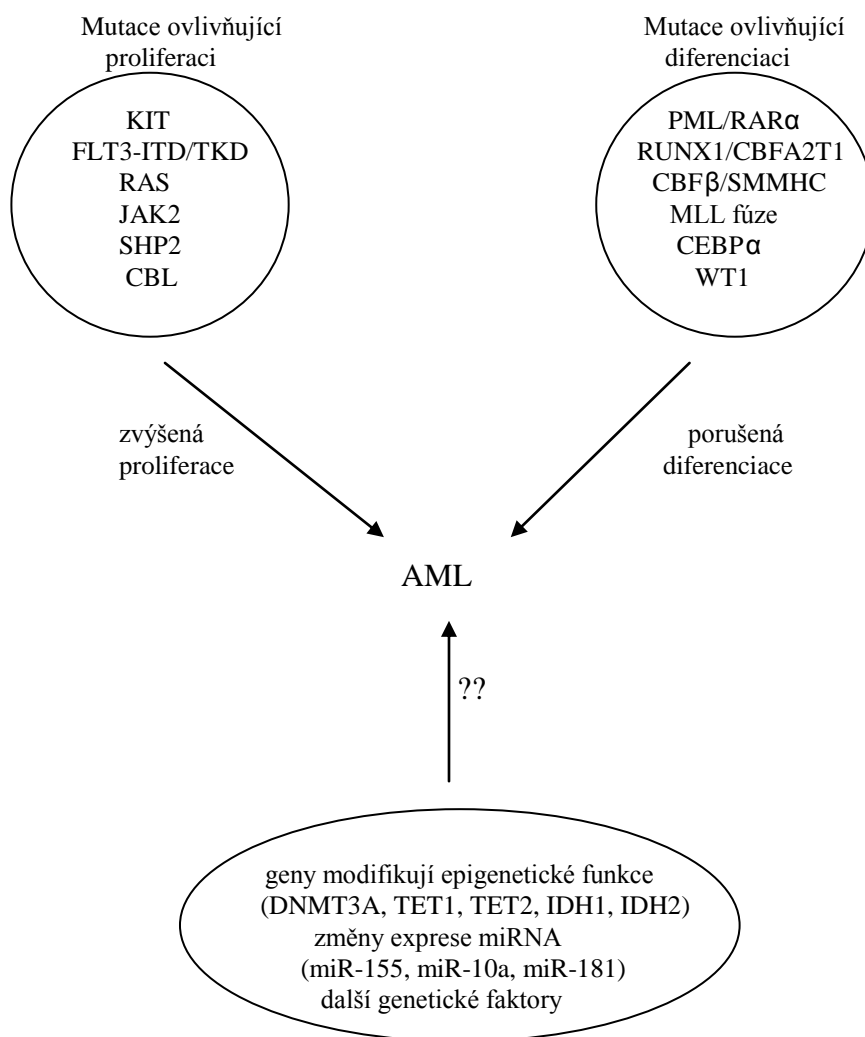
Ionizující záření je spojeno se zvýšeným rizikem rozvoje AML. Mezi lidmi, kteří přežili výbuch atomové bomby v Japonsku byla zaznamenána zvýšená incidence AML s vrcholem mezi 5. až 7.rokem po výbuchu [15]. Uvedený potenciální zevní faktor, v tomto případě

ionizující záření, kdy byla zasažena většina přeživších lidí, jen dokladuje, že rozvoj AML je multifaktoriální, protože přes vyšší incidenci AML u zasažené populace došlo k rozvoji AML jen u malé části zasažených a podobně je tomu i u dalších rizikových faktorů rozvoje AML. Podobně jako v případě atomového výbuchu je i terapeutické ozáření spojeno s vyššími riziky rozvoje AML [16].

Kromě ionizujícího záření se na vyšším riziku rozvoje AML ze zevních vlivů podílejí některé chemické látky. Na prvním místě je nutno jmenovat cytostatika a to především alkylační látky a inhibitory topoizomerázy II, které jsou spojeny s vyšším rizikem rozvoje AML [17,18]. Riziko rozvoje sekundární, s předchozí chemoterapií spojenou, AML je u pacientů po intenzivní cytostatické léčbě 100x vyšší. Současně jsou u těchto s chemoterapií spojených AML prokazovány typické chromozomální aberace, které závisí na typu podaných cytostatik. Například u pacientů léčených alkylačními cytostatiky dochází k rozvoji AML nejčastěji v období 5 až 10 let po skončení léčby a podání alkylačních látek je spojeno s prokazovanými abnormalitami chromozomů 5 a 7 [19]. Kromě cytostatik je řada dalších chemických látek, které jsou spojovány s vyšším rizikem rozvoje AML. Benzen patří k nejvíce studovaným a nejvíce používaným chemickým látkám, které jsou považovány za leukemogenní. Rovněž osoby s chronickou expozicí pesticidům, herbicidům či fixačním látkám mají pravděpodobně vyšší riziko rozvoje AML. Též nikotinismus je spojován s vyšším rizikem rozvoje AML [3,20,21].

2.2.2 Genetický model rozvoje AML

Současná genetická představa rozvoje AML vychází z několikastupňového procesu, jehož podkladem je vznik genetických změn způsobených chromozomálními aberacemi a genovými mutacemi. V tzv. „two-hit“ modelu leukemogeneze je základem rozdělení genových mutací na ty, které vedou k proliferační výhodě, a na ty, které vedou k poruše diferenciaci (viz. obrázek 2). Pro rozvoj AML je pak nutná kombinace těchto aktivujících mutací s mutacemi, které vedou k diferenciacní blokádě. K typickým zástupcům aktivačních mutací patří mutace genu FMS-like tyrozin kinázy 3 (FLT3), KIT nebo Ras mutace. K mutacím, které vedou k bloku diferenciaci, pak patří například mutace genu pro nukleosmin 1 (NPM1) nebo fúzní geny PML/RAR α , CBF β -MYH11 a AML/ETO. Kromě uvedených mutací byla samozřejmě popsána řada dalších genových mutací, které vedou k aktivaci proliferace či naopak blokádě diferenciaci (viz. obrázek 2) [7,22].

Obrázek 2 - Genetický model leukemogeneze

Nicméně samotný genetický model rozvoje AML je mnohem složitější, protože na rozvoji AML se podílí také další genetické aberace, mezi které lze na přední místa zařadit geny modifikující epigenetické vlivy (DNMT3A, TET1, TET2, ASXL, IDH1 atd.). Důležitou roli pak hrají též změny exprese miRNA (např. miR-155, miR-10a atd.), ale též mutace tumor supresorových genů a další genetické aberace. Jednoznačný způsob, kterým se uvedené genetické změny podílí na rozvoji AML, zatím není dostatečně poznán [23, 24]. Uvedený mnohem komplexnější vliv genetických aberací na rozvoj AML podporují výsledky sekvenace genomu blastů AML a srovnání získané sekvence DNA z nádorových leukemických blastů se sekvencí zdravé DNA např. epiteliálních buněk, kdy publikované práce dokladují průměrně asi 700 nukleotidových polymorfismů/mutací ve vyšetřeném genomu AML [25, 26]. Díky stále širší dostupnosti sekvenačních vyšetření, možnosti hodnocení genové exprese, pokrokům v proteomice apod. lze v dalších letech očekávat detailnější specifikaci rozvoje AML na molekulární úrovni [27, 28].

Všechny tyto genetické změny pak vedou k finálnímu patogenetickému mechanismu, jenž je příčinou rozvoje AML, a to k nekontrolované proliferaci a zástavě diferenciace hematopoetické kmenové buňky s poruchou fyziologické autoregulace.

2.3 Klasifikace AML

Klasifikace AML dlouhé roky vycházela především z morfologie leukemických blastů, případně doplněné o cytochemická vyšetření. V minulosti používaná FAB klasifikace dělila akutní myeloidní leukémii do pouhých 8 skupin (viz. tabulka 3) [29].

Tabulka 3 - FAB klasifikace

FAB subtyp	Morfologie
M0	nediferencované blasty
M1	nediferencované myeloblasty
M2	diferencované myeloblasty
M3	hypergranulární promyelocyty
M4	myelomonocytární diferenciace (M4eo s eozinofilii)
M5	monoblastická (5a) monocytární (5b) diferenciace
M6	Erytroblasty
M7	Megakaryoblasty

Nicméně pouhá morfologická klasifikace se s vývojem dalšího poznání a to především s vývojem znalostí v oblasti genetiky AML stala nedostatečnou a v roce 2001 byla nahrazena FAB klasifikace WHO klasifikací, která byla naposledy revidována v roce 2008 [30,31]. WHO klasifikace vychází částečně z původní morfologické klasifikace, nicméně zohledňuje imunofenotypické nálezy a především pak genetické a molekulárně genetické nálezy, kdy jednotlivé jednotky a jejich členění přináší i určitou prognostickou specifikaci.

2.3.1 WHO klasifikace AML

WHO klasifikace vychází částečně z původní morfologické klasifikace, nicméně zohledňuje imunofenotypické nálezy a především pak genetické a molekulárně genetické nálezy, kdy jednotlivé jednotky a jejich členění přináší i určitou prognostickou specifikaci. WHO klasifikace dělí AML na:

➤ **AML s rekurentními genetickými aberacemi**

- AML s t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)
- AML s inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
- Akutní promyelocytární leukémie s t(15;17)(q22;q12); PML-RARα
- AML s t(9;11)(p22q23); MLLT3-MLL + další AML s translokací MLL (11q23) genu
- AML s t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
- AML s inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
- AML (megakaryoblastická) s t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

provizorní:

- AML s mutací NPM1
- AML s mutací CEBPA

Pozn.

- v případě t(8;21), inv(16) nebo t(16;16) je stanovena dg. bez ohledu na počet blastů
- nesmí být historie předchozí cytotoxické nebo radiační léčby

➤ **AML spojená s myelodysplastickými změnami (víceliniovou dysplázií)**

- s předcházejícím MDS
- s víceliniovou dysplázií
- s cytogenetickými aberacemi spojenými s MDS

Pozn.

- nesmí být historie předchozí cytotoxické nebo radiační léčby

➤ **AML (MDS, MPN) spojená s (chemo/radio) terapií**

➤ **AML jinak nespecifikovaná**

- AML minimálně diferencovaná
- AML bez vyzrávání
- AML s vyzráváním
- Akutní myelomonocytární leukémie
- Akutní monoblastická a monocytární leukémie
- Akutní erytroidní leukémie
- Akutní megakaryoblastická leukémie
- Akutní basofilní leukémie
- Akutní panmyelóza s myelofibrozou

➤ **Myeloidní sarkom**

➤ **Myeloidní proliferace spojená s Downovým syndromem**

➤ **Nádor z blastoidních plasmocytoidních dentritických buněk**

➤ **Akutní leukémie nejasné linie**

- Akutní nediferencovaná leukémie
- AML se smíšeným imunofenotypem s t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
- AML se smíšeným imunofenotypem s t(v;11q23); MLL
- AML se smíšeným imunofenotypem B/myeloidní, jinak nespecifikovaná
- AML se smíšeným imunofenotypem T/myeloidní, jinak nespecifikovaná

provizorní:

- Lymfoblastická leukémie/lymfom z NK buněk

2.4 Klinický obraz

Symptomatologie obvykle vyplývá z nedostatku funkčních zdravých krvinek. Samotný rozvoj klinické symptomatologie u nemocného s AML může být velice rychlý a v některých případech je nemocný hospitalizován s život ohrožujícími komplikacemi. Mezi typické klinické projevy AML patří:

- malátnost, únava, pocit vyčerpání, námahová i klidová dušnost, tachykardie, bledost a v některých případech i ischemické bolesti na hrudi - příčinou uvedených obtíží je anémie
- zvýšená četnost infekcí, nedostatečná odpověď infekčních komplikací na antibiotickou léčbu, možnost závažně probíhající i život ohrožující infekce; typicky dochází k zánětům horních cest dýchacích, stomatitidám, angínám – příčinou je nedostatečný počet funkčních granulocytů. Závažná infekce patří k nejčastějším příčinám časně mortality u nemocných s AML.
- krvácivé projevy; typicky dochází k rozvoji petechií, epistaxi, krvácením z dásní, metroragii – příčinou je trombocytopenie a v některých případech i disseminovaná intravaskulární koagulopatie (typicky u AML M3). Závažné krvácení, typicky do CNS, patří mezi nejčastější příčiny časně mortality nemocných s AML.
- zvýšené teploty i horečky bez jednoznačné infekční příčiny.
- hyperplázie dásní, kožní infiltráty (viz. obrázek 1), postižení CNS – typicky u nemocných s leukémií vycházející z monocytoidní řady.
- projevy leukostázy u nemocných s vysokou ($>100 \times 10^9/l$) vstupní hodnotou cirkulujících blastů; typickými projevy leukostázy jsou dušnost, bolest na hrudi, bolest hlavy, alterace mentálního stavu, parézy kraniálních nervů, priapismus. Pacienti s vysokými vstupními hodnotami cirkulujících blastů mají vyšší riziko postižení CNS a jsou významně ohroženi rozvojem “tumor lysis” syndromu po zahájení cytostatické léčby

Kromě uvedených klinických projevů nemusí být přítomna žádná další patologie. V některých případech může být rozvoj symptomatologie pozvolný a v ojedinělých případech může být stanovena diagnóza AML při dovyšetření náhodně zaznamenaných změn v krevním obrazu provedeném například z důvodu preventivního vyšetření. V případě AML dochází na rozdíl od akutní lymfoblastické či chronické myeloidní nebo lymfatické leukémie méně často ke zvětšení lymfatických uzlin či sleziny, i když u některých případů leukémií původem z monocytární řady je zaznamenáváme též [1].

Obrázek 3. Kožní infiltrát při AML



2.5 Diagnostické metody u AML

K definitivnímu stanovení diagnózy AML; obvykle na základě suspekce vzniklé při zjištění změn krevního obrazu a výše uvedené klinické symptomatologii; se využívá několik diagnostických metod, které slouží nejen k samotné diagnostice a možnosti přesné klasifikace AML, ale současně též k upřesnění prognózy AML a stanovení markerů vhodných k monitoraci léčebné odpovědi.

2.5.1 Krevní obraz

K potvrzení suspekce a případně i samotnému stanovení diagnózy AML slouží vyšetření hodnot krevního obrazu a provedení mikroskopického diferenciálního krevního rozpočtu. Především provedení mikroskopického diferenciálního rozpočtu je důležité, protože pouhé vyšetření diferenciálního rozpočtu pomocí automatického analyzátoru může vést k chybnému zařazení blastů mezi monocyty či lymfocyty.

Samotné hodnoty krevního obrazu mohou být různé. Obvykle bývá přítomna leukocytóza se zmnožením blastů v diferenciálním rozpočtu (obvykle chybí další elementy vývojové řady granulopoezy = *hiatus leucaemicus*) a současně je přítomna anémie a trombocytopenie. Nicméně krevní obraz může být i normální nebo jen s mírnými změnami hodnot a jen v diferenciálním rozpočtu jsou přítomny blasty. V některých případech může být přítomna leukopenie a nemusí být přítomny blasty v diferenciálním rozpočtu. Extrémní leukocytóza ($>100 \times 10^9/l$) je u akutních leukémií méně častá (10%) a častěji ji zachytíme u chronické myeloidní nebo lymfatické leukémie. Pro potvrzení diagnózy AML musí být v diferenciálním rozpočtu $> 20\%$ blastů.

2.5.2 Morfologické vyšetření kostní dřeně

Sternální punkce a aspirát kostní dřeně patří k základním diagnostickým vyšetřením v případě potvrzení či stanovení diagnózy AML. Nátěry kostní dřeně jsou hodnoceny za použití barvení May-Grünwald-Giemsa nebo Wright-Giemsa. K validnímu zhodnocení nátěrů aspirátu kostní dřeně se doporučuje vyšetření alespoň 200 leukocytů a 500 nukleárních buněk [32]. Pro diagnózu AML je podmínkou přítomnost $\geq 20\%$ blastů. Výjimkou jsou AML s průkazem $t(15;17)$, $t(8;21)$, $inv(16)$ nebo $t(16;16)$ a některé typy erytroleukémie. V případě monocytární či myelomonocytární diferenciace jsou mezi blasty započítávány též monoblasty a promonocyty. Naopak erytroblasty nejsou mezi blasty zahrnuty kromě vzácného případu čisté erytroidní leukémie.

Ke zhodnocení příslušnosti blastů k myeloidní či jiné linii byly historicky využívány cytochemické metody, kdy pomocí barvení nátěru aspirátu různými barvivy bylo možno upřesnit příslušnost blastů k jednotlivým liniím. V současné době je tato metodika nahrazována imunofenotypizací. Nicméně nadále lze k upřesnění diagnostiky ve smyslu stanovení příslušnosti blastů k myeloidní linii při nedostupnosti imunofenotypického vyšetření využít cytochemické vyšetření k průkazu myeloperoxidázy či barvení na lipidy (sudánská čern). Při negativitě těchto vyšetření lze pak využít k průkazu příslušnosti blastů k monocytární a tím tedy myeloidní linii stanovení positivity nespecifické esterázy.

Samotné provedení aspirátu kostní dřeně pomocí sternální punkce je vhodné ponechat specializovanému pracovišti, které se diagnostice a léčbě leukémií věnuje vzhledem k potřebě odeslání aspirátu na další specializovaná vyšetření.

Histologické vyšetření kostní dřeně pomocí trepanobiopsie není ke stanovení diagnózy AML obvykle nezbytné. Nicméně v situaci, kdy není úspěšná aspirace kostní dřeně (suchá jehla) například v případě zmnožení vaziva, je trepanobiopsie nezbytná [1,32].

2.5.3 Imunofenotypizace

Imunofenotypizace za použití vícebarevného průtokového cytometru patří k důležitým vyšetřením v diagnostice AML a v monitoraci léčebné odpovědi u AML. Imunofenotypizace slouží k upřesnění příslušnosti blastů k jednotlivým vývojovým liniím (viz. tabulka 4) a umožňuje detekovat aberantní expresi znaků, která přesně definuje leukemické blasty, což následně umožní s citlivostí až 1:10000 monitoraci reziduální nemoci po léčbě. U některých diagnostických jednotek, mezi které patří AML s minimální diferenciací, akutní megakaryocytární leukémie a akutní leukémie nejasné linie, je pak imunofenotypický průkaz exprese povrchových a cytoplasmatických antigenů ke stanovení diagnózy nezbytný [32].

Tabulka 4 - Expresie povrchových a cytoplasmatických markerů u AML

Prekurzory	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Granulocytární znaky	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cytoplasm.MPO
Monocytární znaky	nespecif.esteráza (NSE), CD11c, CD14, CD64, lysozyme, CD4, CD11b, CD36
Megakaryocytární znaky	CD41 (glykoprotein IIb/IIIa), CD61 (glykoprotein IIIa), CD42 (glykoprotein 1b)
Erytrocytární znaky	CD235a (glycophorin A)

Některé AML s rekurentními cytogenetickými aberacemi jsou spojené s charakteristickými imunofenotypickými nálezy. Například AMLs t(8;21) je často spojena s aberantní expresí typického B-lymfoidního markeru CD19 a méně často CD7. Podobně blasty AML s inv(16) exprimují typický T-lymfoidní znak CD2. V případě AML s mutací NPM1 genu se uvádí vysoká exprese znaku CD33 a chybějící nebo nízká exprese znaku CD34. Samotná průtoková cytometrie by neměla být používána ke kvantifikaci blastické populace. [32]

2.5.4 Cytogenetické vyšetření

Konvenční cytogenetické vyšetření patří k mandatorním vyšetřením diagnostiky AML. Chromozomální aberace jsou detekovány asi u 40-60% diagnostikovaných AML v dospělém věku a detekce některých chromozomálních změn slouží k přesné kategorizaci AML. WHO klasifikace rozeznává 7 jednotek AML s rekurentními chromozomálními translokacemi a inverzemi a cytogenetické vyšetření je tedy nezbytné k správné

kategorizaci AML. Podobně některé chromozomální aberace jsou dostatečné ke stanovení diagnózy AML s myelodysplázií spojenými změnami.

K validnímu vyšetření by mělo být hodnoceno 20 jader v metafázi a obvykle je využíváno klasické G-pruhování [32]. Samotné cytogenetické vyšetření kromě možnosti správné kategorizace AML přináší významnou prognostickou informaci umožňující odhad efektu cytostatické léčby a volbu strategie léčby AML (viz. kapitola 2.6. Prognóza). V menší míře lze pak využít zjištěné cytogenetické chromozomální aberace k monitoraci reziduální nemoci. Význam cytogenetiky v monitoraci reziduální nemoci je však limitován nižší senzitivitou metodiky.

Vzhledem k významu cytogenetického vyšetření v rámci diagnostiky a určení prognózy AML by mělo být vyšetření prováděno kvalifikovanou cytogenetickou laboratoří.

Tabulka 5 - Časté cytogenetické abnormality a jejich souvislosti [33]

Chromozomální aberace	Morfologie (FAB)	Zavzaté geny	Typický věk	Incidence	Prognóza	Komentář
t(8;21)	M2	RUNX1/RUNX1T1	30	5-7%	dobrá	typicky Auerovi tyče
t(15;17)	M3	PML/RAR α	40	5-8%	velmi dobrá	často DIC
t(11;17)	M3	ZBTB16/ RAR α	?	<1%	špatná	
abn(16q22)	M4eo	CBF β /MYH11	35-40	5%	dobrá	
abn(11q23)	M5	MLL s řadou parnter.genů	>50	3%	špatná kromě t(9;11)	vysoká leukocytóza, extramedulární postižení
+8	různá		>60	3% (izolovaná)	špatná	často spojena s jinými aberacemi
del5,del7, 5q-, 7q-	různá, často u M6		>60	15-20%	špatná	často u sekundárních AML
inv(3)	abnormální megakaryocyty	RPN1/MECOM	?	<1%	špatná	vyšší počet trombocytů, další genetické aberace
abn(17p)	Různá	T53	<60	5%	špatná	často další nepříznivé aberace
t(6;9)(p2;q34)	M2/M4 s basofilii	DEK/NUP214	?	<1%	špatná	dominující basofilie
+13	Různá		>60	1-2%	špatná	
t(9;22)	M1	BCR/ABL1	>50	1%	špatná	splenomegalie
t(1;22)	často M7	RBM15/MKL1	0-2	<1%	špatná	organomegalie
t(8;16)	M4 nebo M5	KAT6A/CREBBP	?	<1%	špatná	erytrofagocytóza

2.5.5 Molekulárně - cytogenetické vyšetření

V případě selhání vyšetření klasickou cytogenetikou nebo k upřesnění například fúzního partnera MLL genu lze využít metod molekulární cytogenetiky, které je prováděno z materiálu odebraného pro samotné klasické cytogenetické vyšetření. Klasickou metodou je tzv. „Fluorescence in situ hybridization (FISH)“ vyšetření, jenž umožňuje na nedělicích se jádrech detekovat fúzní geny, delece či monosomie chromozomů.

2.5.6 Molekulárně - genetické vyšetření

Minimálně u nemocných s nově diagnostikovanou AML, u kterých připadá v úvahu intenzivní léčba, by měl být odebrán vzorek z kostní dřeně (eventuálně periferní krve) k molekulárně genetickému vyšetření. Ideálně by měla být provedena izolace DNA a RNA k dalšímu dovyšetření. V případě nedostatku materiálu k izolaci obou nukleových kyselin by měla být upřednostněna izolace RNA [32].

Samotné molekulárně genetické vyšetření využívající řadu molekulárně genetických technik (PCR, kvantitativní PCR, fragmentační analýza, sekvenace atd.) vzhledem k zařazení molekulárně genetických markerů do provizorních jednotek WHO klasifikace (AML s NPM1 resp. CEBP α mutací) umožňuje přesnou kategorizaci AML. Současně v případě neuspokojivých výsledků cytogenetického vyšetření může především v případě průkazu fúzních genů tuto metodiku plně nahradit. Zásadní je pak role molekulárně genetického vyšetření v detekci mutací genů, případně průkazu jejich zvýšené exprese atd. k upřesnění prognózy AML. Molekulárně genetických metod při detekci vhodného molekulárního markeru (fúzní gen, mutace NPM1) pak můžeme využít k monitoraci reziduální nemoci v průběhu další léčby a molekulárně genetická monitorace reziduální nemoci patří k nejspecifičtějším a nejsenzitivnějším metodám její detekce (citlivost až 1:100000).

Vzhledem k významu molekulárně genetického vyšetření v rámci diagnostiky a především pak určení prognózy AML a možnosti monitorace reziduální nemoci by mělo být vyšetření prováděno kvalifikovanou molekulárně genetickou laboratoří.

2.5.7 Další vyšetření a postupy v iniciální diagnostice AML

- anamnéza – důležité je zjištění eventuální expozice toxickým látkám v minulosti, případně předchozí cytostatické léčbě. Vhodná je též znalost dalších onemocnění (kardiální, respirační, GIT, infekční atd.) k možnosti zhodnocení rizik léčby u daného pacienta. Nutná je znalost užívaných léků a případné alergie (především pak na ATB eventuálně kontrastní látku apod.). Mezi důležité anamnestické informace patří rodinná anamnéza především s ohledem na ověření eventuální dostupnosti dárce krvetvorných buněk v rodině.
- fyzikální vyšetření – ke zhodnocení aktuálního klinického nálezu a možnosti zhodnotit celkový stav nemocného, který opět významně ovlivňuje rizika případné léčby.
- biochemie a koagulační testy – ke zhodnocení jaterních a renálních funkcí, ke zhodnocení stavu vnitřního prostředí, k diagnostice případné hyperurikémie, koagulopatie, elevace zánětlivých markerů atd. U žen v reprodukčním věku by měl být proveden těhotenský test.
- mikrobiologické vyšetření – ke zhodnocení kolonizace potenciálně patogenními mikroorganismy. Důležitá je též serologické vyšetření hepatitid, CMV a HIV.
- HLA vyšetření – vzhledem k časté nutnosti provedení alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloTx) jako konsolidační léčby AML je vhodné již vstupně u potenciálních kandidátů transplantace vyšetřit HLA. Současně ke zkrácení doby nutné k vyhledání dárce krvetvorných buněk je vhodné zahájit u pacientů s nově diagnostikovanou AML a tím tedy možnou indikací k aloTx i vyšetření k nalezení

potenciálního rodinného dárce (náběry členů rodiny). Vyhledávání nepříbuzného dárce prostřednictvím registru dobrovolných dárců by pak mělo být zahájeno obratem po upřesnění prognózy AML (tzn. v případě faktorů indikujících k transplantaci) a nepřítomnosti rodinného dárce, která byla ověřena ihned po stanovení diagnózy AML.

- MR mozku, lumbální punkce s vyšetřením mozkomíšního moku – tato vyšetření by měla být provedena u nemocných s centrální neurologickou symptomatologií vzbuzující suspekci na možné postižení CNS leukémií nebo případně krvácením, které vzhledem k časté trombocytopenii nebo koagulopatii může komplikovat stav pacienta s nově diagnostikovanou AML a např. krvácení do CNS patří mezi jednu z nejčastějších příčin časného úmrtí nemocných po stanovení diagnózy AML. Dále by uvedená vyšetření měla být provedena u nemocných s vysokou vstupní leukocytózou nebo s monocytoidní diferenciací blastů.
- Echokardiografické vyšetření, EKG, RTG/CT plic, funkční vyšetření plic – tato vyšetření by měla být provedena především u starších pacientů před zahájením intenzivní léčby k ověření kardiopulmonálních funkcí nebo u nemocných s anamnézou kardiovaskulárního či plicního onemocnění.
- Kryoprezervace spermatu, oocytů – chemoterapie může poškodit u nemocného i trvale reprodukční funkce. Proto pokud to stav dovolí je vhodné nemocné poučit a případně nabídnout možnost kryokonzervace spermatu či oocytů.

2.6 Prognóza

Již samotná klasifikace AML ukazuje, že se v případě AML nejedná o uniformní onemocnění a že prognóza nemocných s diagnostikovanou AML se může lišit. Na základě publikovaných dat výsledků léčby AML lze prognostické faktory u tohoto onemocnění dělit na faktory, které souvisí se samotným onemocněním tedy AML a na faktory, které souvisí s pacientem, u kterého byla diagnóza AML stanovena. Vyšetření a přesné hodnocení prognostických faktorů se stanovením prognózy onemocnění u daného konkrétního pacienta je nezbytné k rozhodnutí o samotné léčbě nemocného a způsobu této léčby.

2.6.1 Prognostické faktory související s pacientem

1. Věk:

Starší pacienti s AML mají často další závažná onemocnění a ve vyšším procentu jsou v době diagnózy AML ve špatném celkovém stavu, což vede k horší toleranci intenzivní chemoterapie a následně i vyšší léčebné mortalitě [34,35]. U starších pacientů též častěji diagnostikujeme sekundární AML na podkladě předchozího hematologického onemocnění či AML související s předchozí cytostatickou léčbou, které mají vysoce nepříznivou prognózu a nedostatečně odpovídají na cytostatickou léčbu případně časně relabují [36]. Nicméně samotný věk je nezávislý prognostický faktor a s narůstajícím věkem i při zohlednění dalších prognostických faktorů (celkového stavu, cytogenetiky, typu AML atd.) se zhoršují výsledky léčby AML [34,35].

Tabulka 6 - Vliv věku na výsledky léčby AML [34]

Věk	dosažení KR AML (%)	medián přežití (měsíce)
<56 let	64	18,8
56-65 let	46	9,0
66-75 let	39	6,9
>75 let	33	3,5

2. Celkový stav:

Výsledky léčby AML závisí též na celkovém stavu pacienta v době diagnózy. Nepříznivý celkový stav nemocného vede k horší toleranci intenzivní léčby a vyššímu riziku léčebné mortality, která se může u pacientů ve stejné věkové skupině pak statisticky významně lišit [34,35]. Například u pacientů ve věku nad 75 let a v celkovém stavu dle kritérií ECOG 0-1 je mortalita do dne +30 od zahájení intenzivní léčby AML nižší než 10%, v případě ECOG 2 pak 21% a v případě ECOG 3 40% [34]. Celkový stav samozřejmě tedy i finálně ovlivňuje šanci na dosažení kompletní remise (KR) AML po chemoterapii. Švédští autoři na základě analýzy švédského registru nemocných s AML dokladují šanci na dosažení remise u pacientů ve věku 60-70 let v případě dobrého celkového stavu (WHO-PS 0-2) v 50-70% a naopak u pacientů ve špatném celkovém stavu (WHO-PS 3-4) jen v 30% [35].

Tabulka 7 - Věk a celkový stav: šance na dosažení KR AML [35]

Věk	WHO-PS:	0	1	2	3-4
60-64 let	KR:	60-70%	60-70%	60-70%	40%
65-69 let		60-70%	60-70%	50%	30%
70-79let		60-70%	50%	45%	30%
➤ 80 let		50%	30%	30%	20%

Tabulka 8 - Věk 70-79 let a celkový stav: mortalita do dne +56 [35]

WHO-PS	úmrť do dne +56 po zahájení léčby
0	9%
1	11%
2	23%
3	38%
4	71%

3. Přidružená onemocnění:

Pacient s nově diagnostikovanou AML může mít často další závažná např. interní onemocnění a ačkoliv je v době diagnózy v uspokojivém celkovém stavu, tak tato další

onemocnění vedou k horší toleranci intenzivní chemoterapie a komplikací s ní spojených, což může vést k vyšší léčebné mortalitě. Je řada skórovacích systémů hodnotících závažnost přidružených onemocnění. U hematologicko-onkologických pacientů včetně nemocných s AML je používán „Hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index (HCT-CI)“ [37]. Systém hodnotí postižení jednotlivých orgánů a další parametry rizikovými body (viz. tabulka 9). Výsledný součet pak ukazuje prognózu nemocného. Tento skórovací systém je validován pro pacienty, kteří podstupují aloTx, ale svou platnost dle publikovaných výsledků prokázal i v předpovědi rizik intenzivní léčby u nemocných s AML [38]. Vliv HCT-CI na mortalitu a celkové přežití nemocných starších 60 let s AML ukazuje tabulka 10.

Tabulka 9 - HCT-CI definice [37]

onemocnění	Definice	Skóre
Arytmie	fibrilace nebo flutter síní, „sick sinus“ syndrom, ventrikulární arytmie	1
kardiální	závažná skleróza koronárních tepen, srdeční selhávání, infarkt myokardu, EF<50%	1
zánětlivé onemocnění GIT	Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida	1
cerebrovaskulární	TIA, ictus	1
psychiatrické	deprese, úzkost vyžadující psychiatrickou konzultaci či léčbu	1
jaterní (lehké)	hepatitida, zvýšený bilirubin do 1,5 násobku normy, AST/ALT zvýšené do 2,5 násobku normy	1
Obezita	BMI > 35 kg/m ²	1
infekční	infekce vyžadující antimikrobiální léčbu	1
revmatologické	SLE, RA, polymyozitida atd.	2
vředová choroba žaludku	vyžadující léčbu	2
renální (střední/těžké)	sérový kreatinin>176,8 umol/l, dialýza, předchozí transpl. Ledviny	2
plicní (střední)	DLCO a/nebo FEV1 66%-80%, dušnost při lehčí aktivitě	2
předchozí nádorové onemocnění	léčeno kdykoliv v minulosti kromě karcinomu kůže	3
plicní (těžké)	DLCO a/nebo FEV1 <65%, klidová dušnost, potřeba oxygenoterapie	3
jaterní (těžké)	Jaterní cirhóza, zvýšený bilirubin nad 1,5 násobku normy, AST/ALT zvýšené nad 2,5 násobku normy	3
chlopenní vada	kromě prolapsu mitrální chlopně	3

Tabulka 10 - Vliv HCT-CI na časnou mortalitu a přežití u nemocných starších 60 let s AML léčených intenzivní chemoterapií [38].

HCT-CI	úmrť do dne +28	medián přežití (týdny)
0	3 %	45
1-2	11%	31
3 a více	29%	19

2.6.2 Prognostické faktory související s AML

Řada biologických faktorů souvisejících s AML hraje významnou roli v určení prognózy AML. K ověřeným prognostickým faktorům patří rozsah nádorového onemocnění, typ akutní myeloidní leukémie resp. způsob jejího vzniku a k nejvýznamnějším a nejsilnějším prognostickým faktorům patří cytogenetické aberace leukemických blastů. V posledních letech s rozvojem laboratorních metod významně vstupují do prognostických schémat nálezy molekulárně genetických vyšetření. V posledních letech se též ve zvýšené míře ukazuje jako prognosticky vysoce významné hodnocení odpovědi AML na podanou chemoterapii a to především ve smyslu průkazu zbytkové nemoci.

1. Rozsah nádoru:

Klinické a laboratorní markery velké nádorové masy, mezi které patří leukocytóza, organomegalie a vysoká hladina LDH jsou dle publikovaných dat nepříznivým prognostickým faktorem AML [39,40,41]. V případě počtu leukocytů v periferní krvi se zdá jako hranice svědčící pro vyšší riziko AML počet leukocytů vyšší než $30 \times 10^9/l$, kdy vyšší leukocytóza především zvyšuje rizika časného úmrtí v době intenzivní indukční léčby [42].

2. Typ AML – sekundární AML:

Asi u 20% pacientů dochází k rozvoji sekundární AML. Definice sekundární leukémie není jednoznačně stanovena, ale tento termín se standardně používá pro AML, která vzniká na podkladě předchozího hematologického onemocnění (obvykle myelodysplastického syndromu nebo myeloproliferativního onemocnění) nebo v souvislosti s předchozí chemoterapií nebo radioterapií pro jiné hematologické nebo nehematologické nádorové onemocnění. Sekundární AML se stává v současnosti významným medicínským problémem, protože její incidence, a to především ve vyšších věkových kategoriích z důvodu prodloužení života a účinnější léčby nádorových onemocnění, narůstá. Sekundární AML má neuspokojivé léčebné výsledky s nízkou šancí na dosažení KR AML a celkového přežití [43]. Příčinou nepříznivé prognózy u sekundární AML je zřejmě vyšší zastoupení nepříznivých cytogenetických aberací ve srovnání s nově diagnostikovanou AML [44,45]. V případě sekundární AML na podkladě předchozí cytostatické léčby byl prognosticky nepříznivý cytogenetický nálezy zjištěn u 46% případů ve srovnání s 20% u nově diagnostikované AML [45]. Samotné výsledky léčby sekundární AML jsou tedy nepříznivé. Například u sekundární AML vzniklé na podkladě MDS bylo intenzivní léčbou dosaženo KR u 41% pacientů a 3 leté přežití bylo 8%, což jsou statisticky významně horší výsledky ve srovnání s nově diagnostikovanou AML, u které bylo dosaženo KR u 71% nemocných a 3 letého přežití bylo dosaženo u 36% pacientů [46]. Podobně nepříznivé léčebné výsledky díky vyššímu zastoupení nepříznivých cytogenetických nálezů byly reportovány u nemocných s AML na podkladě předchozí cytostatické léčby (viz. Tabulka 11.).

Tabulka 11 - Srovnání výsledků dle cytogenetických nálezů u pacientů s chemo/radioterapií spojené AML a nově diagnostikované AML [47]

Karyotyp	t-AML (n=121)	nově dg. AML (n=1511)	medián přežití (měsíce) t-AML	medián přežití (měsíce) nově dg. AML
Příznivý	24%	20%	27	Nedosažen
Intermediární	28%	60%	12	16
Nepříznivý	48%	20%	6	7

3. Cytogenetika:

Karyotyp leukemických buněk je nejsilnější prognostický marker, jenž definuje šanci na dosažení KR AML a dlouhodobé přežití. Cytogenetický nálezn rozděljuje AML na AML s příznivou, intermediární a nepříznivou cytogenetikou resp. prognózou [48,49]. Jednotlivé cytogenetické aberace, které definují prognostické skupiny AML se mezi jednotlivými publikovanými pracemi mírně liší. Nově publikované analýzy cytogenetický nálezn a jeho význam dále upřesňují a pro sjednocení hodnocení cytogenetického nálezu a zařazení AML do správné prognostické skupiny, především v rámci klinických studií, vydala t.č. nejvíce užívané doporučení cytogenetické stratifikace AML evropská pracovní skupina pro studium leukémií „LeukemiaNet“, která k cytogenetickým nálezům přiřadila do stratifikace AML též 3 molekulárně genetické markery (viz. tabulky 12 a 13) [32,50]. Nověji se do prognosticky vysoce nepříznivé kategorie zařadila AML s tzv. monozomálním karyotypem, která je definována jako přítomnost jedné autozomální monozomie a ještě jedné další monozomie nebo jiné chromozomální aberace [51,52].

Tabulka 12 - Revidovaná MRC AML cytogenetická klasifikace [50]

<i>Riziková skupina</i>	<i>Cytogenetický nálezn</i>
Příznivá	t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13q22)
Intermediární	t(3;5)(q21-25;q31-35) t(9;11)(p21-22;q23) t(11;19)(q23;p13) jiné aberace, která nejsou definovány jako příznivé či nepříznivé
Nepříznivá	inv(3)(q21;q26), jiné 3q abnormality add(5q)/del(5q),-5 add(7q)/del(7q),-7 t(11q23;v) kromě výše uvedených t(9;22)(q34q11) -17/abn(17p) komplexní aberace (≥ 4 nesouvisející aberace)

Tabulka 13 - ELN doporučení stratifikace AML dle genetických a molekulárně genetických nálezů (bez APL) [32]

<i>Riziková skupina</i>	<i>Genetický nález</i>
Příznivá	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13q22); CBF β -MYH11 mutace NPM1 bez FLT3/ITD (+normální karyotyp) mutace CEBP α (+normální karyotyp)
Intermediární -1	mutace NPM1 a FLT3/ITD (+normální karyotyp) bez mutace NPM1 s FLT3/ITD (+normální karyotyp) bez mutace NPM1 bez FLT3/ITD (+normální karyotyp)
Intermediární -2	t(9;11)(p21-22;q23); MLLT3-MLL jiné aberace, které nejsou definovány jako příznivé či nepříznivé
Nepříznivá	inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVII t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(11q23;v) kromě výše uvedené t(9;11) del(5q),-5 -7 abn(17p) komplexní aberace (≥ 3 nesouvisející aberace)

Uvedené cytogenetické prognostické skupiny tedy nejvíce upřesňují prognózu diagnostikované AML. V případě příznivé cytogenetické rizikové skupiny (cca 25% AML) lze očekávat při léčbě chemoterapií dosažení KR AML až u 90% případů a 5 leté celkové přežití 65%. Naopak u nepříznivé cytogenetické rizikové skupiny (cca 20% AML) je při samotné cytostatické léčbě šance na dosažení KR AML asi 60% a 3 leté celkové přežití je 10% [53,54]. Jště horší léčebné výsledky jsou pak reportovány u AML s monozomálním karyotypem, kdy je KR AML dosahováno asi u 30-40% případů a 5 leté celkové přežití je nižší než 10% [52]. Léčebná odpověď a šance na vyléčení u intermediární cytogenetické rizikové skupiny se pohybuje mezi výsledky příznivé a nepříznivé skupiny a závisí většinou na dalších prognostických faktorech, mezi které patří především molekulárně genetické nálezy (viz.níže). Výše uvedené výsledky jednotlivých cytogenetických prognostických skupin se týkají léčby samotnou intenzivní chemoterapií. Tyto výsledky ve smyslu snížení rizika relapsu AML a zlepšení celkového přežití pacientů s AML může v současné době především u nemocných s vyšším cytogenetickým rizikem AML zlepšit zařazení aIoTx do jejich léčby [53,54]. Z uvedeného tedy vyplývá, že cytogenetická stratifikace nejen zásadně upřesňuje prognózu AML, ale má vliv i na volbu léčebné strategie, což jen podtrhuje nezbytnost cytogenetického vyšetření.

4. Molekulární genetika:

Díky rozvoji molekulárně genetických metod byla v posledních letech detekována řada molekulárních změn leukemických blastů. Uvedené molekulární genetické aberace přinášejí důležité informace přispívající k objasnění molekulárních příčin leukemogeneze. Současně se stávají zjištěné molekulární aberace cílem pro vývoj nových léčebných postupů (např. inhibitory FLT3 kinázy apod.). V rámci prognostického významu byly pak uvedené molekulární aberace zkoumány především k upřesnění prognózy u skupiny AML, u kterých byl detekován normální karyotyp tzn. skupina AML s intermediární prognózou. U některých z těchto aberací pak byl

potvrzen jejich prognostický význam a molekulárně genetické nálezy se staly i součástí revidované WHO klasifikace AML či součástí prognostického dělení AML společně s nálezy cytogenetickými [2,32]. Některé molekulárně genetické změny zatím mají nejasný prognostický význam a v současnosti probíhá jejich další studium. Další významnou roli mají detekované molekulárně genetické aberace pro jejich využití ke stanovení a monitoraci zbytkové nemoci tzv. minimální reziduální nemoci (MRN), která jako marker odpovědi AML na léčbu má zřejmě zásadní prognostický význam, který bude zmíněn v další kapitole.

V rámci samotných molekulárně genetických prognostických markerů se na molekulární úrovni jedná především o genové mutace či hyperexpresi některých genů. K ověřeným či nejčastěji publikovaným a zmiňovaným molekulárně genetickým prognostickým markerům patří:

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3):

FLT3 je membránový receptor s vnitřní tyrosinkinázovou aktivitou. Mutace genu pro tento receptor patří k prvním genovým mutacím popsaným u AML s prognostickým významem. Jeho stavba, funkce, typ mutací a vliv a význam u AML byly ve srovnání s ostatními mutacemi nejvíce studovány. V současnosti jsou dokonce klinicky zkoušeny v rámci léčby AML cílené léky inhibující jeho funkci.

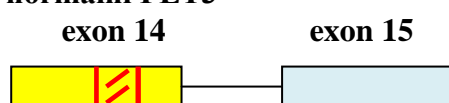
FLT3 receptor se skládá se z 4 částí, mezi které patří extracelulární vazebná doména pro FLT3 ligand, transmembránová doména, juxtamembránová doména a intracelulární kinázová doména. FLT3 je primárně exprimován na myeloidních a lymfoidních progenitorových buňkách a s variabilní expresí pak na zralých elementech monocytární řady. FLT3 exprese byla též popsána v játrech, slezině a thymu [55,56]. Pokud není FLT3 receptor stimulován je v monomerní formě s inaktivovanou, nefosforylovanou intracelulární kinázovou doménou. V případě navázání FLT3 ligandu prochází receptor konformační změnu a dochází k dimerizaci receptoru, což vede k aktivaci intracelulární tyrosinkinázové domény. V důsledku její aktivace pak dochází prostřednictvím dalších cytoplasmatických proteinů (SHC proteiny, GRB2, GAB2, SHIP, CBL atd.) ke kaskádové fosforylaci, což následně vede k aktivaci sekundárních mediátorů (MAP kinase, STAT, AKT/PI3) a finálně v buněčném jádře k aktivaci a regulaci buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptózy. FLT3 aktivace tedy obecně vede k regulaci řady buněčných procesů, které jsou kritické pro řízení normální krvetvorby a buněčného růstu [57,58].

K základním mutacím genu FLT3 u AML patří interní tandemová duplikace FLT3 genu (FLT3/ITD), která postihuje juxtamembránovou doménu a mutace v oblasti aktivační kličky tyrosinkinázové domény (FLT3/ALM). FLT3/ITD je prokazována asi u 15-30% AML a v případě AML s normálním karyotypem pak asi u 30-40% případů. FLT3/ALM je prokazována u 5-10% AML [57,59]. Podstatou FLT3/ITD mutace je variabilní duplikace nukleotidů 14.exonu FLT3 genu (viz. obrázek 4). Místo a délka duplikované genové části se liší. U některých pacientů s AML pak můžeme někdy i zastihnout několik patologických klonů s různou délkou duplikované části. Obvykle je mutována pouze jedna alela genu FLT3, což znamená, že je prokazován i normální FLT3 gen. Nicméně u některých pacientů dominuje přítomnost FLT3/ITD, kde se za biologickou podstatu tohoto jevu považuje mechanismus unipaternální dizomie chromozomu 13, která může už v počátečním stádiu leukemogeneze vést ke vzniku leukemického klonu s převahou FLT3/ITD. V průběhu progresu AML pak může identický efekt navodit mechanismus mitotické rekombinace a vysvětlit homozygotní stav u pacienta, který se

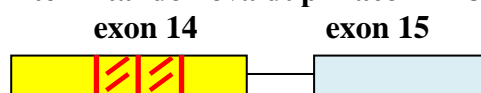
původně vyznačoval heterozygotním zastoupením FLT3/ITD. V případě FLT3/ALM je podstatou bodová mutace v oblasti kódující aktivační kličku [57,59,60,61]. Obě mutace vedou k spontánní aktivaci tyrosinkinázové domény FLT3 receptoru. V případě FLT3/ITD in vitro studie prokázaly, že FLT3/ITD způsobuje spontánní dimerizaci FLT3 receptoru a tím i spontánní aktivaci intracelulární kinázové domény, což aktivací dalších drah vede k nezávislé buněčné proliferaci. Juxtamembránová doména receptoru, která je FLT3/ITD mutací ovlivněna, tedy zřejmě hraje rozhodující roli v dimerizaci a tím aktivaci receptoru a změna její délky vede zřejmě v závislosti na velikosti této změny k různému stupni spontánní dimerizace a aktivace receptoru [59,60,61].

Obrázek 4 - FLT3 interní tandemová duplikace

normální FLT3



interní tandemová duplikace FLT3



Pacienti s AML a FLT3/ITD mají obvykle normální karyotyp a obvykle je přítomna leukocytóza. Často se jedná o AML s myelomonocytární či monocytární diferenciací. Klinický význam průkazu FLT3/ITD je nepříznivý. Pacienti s AML a FLT3/ITD léčení samotnou chemoterapií mají signifikantně vyšší riziko relapsu a horší celkové přežití (viz tabulka 14) než pacienti s AML bez přítomnosti FLT3/ITD [61, 62, 63, 64, 65].

Tabulka 14 - Vliv FLT/ITD na výsledek léčby AML chemoterapií [63]

	celkově	FLT3/ITD-	FLT3/ITD+	P
Počet pacientů	854	627	227	
Odpověď na léčbu				
KR AML	82%	84%	78%	0.05
PR AML	8%	7%	11%	0.04
Rezist.AML	10%	9%	11%	0.4
5-leté výsledky				
Frekvence relapsu	49%	44%	64%	<0.001
DFS	42%	46%	30%	<0.001
EFS	35%	39%	23%	<0.001
OS	41%	44%	32%	<0.001

Kromě samotného průkazu FLT3/ITD byla v rámci výzkumu a klinických studií vynaložena snaha o další diferenciaci prognózy v samotné skupině pacientů s AML a průkazem FLT3/ITD [61,66]. V rámci této skupiny pacientů se zdá, že nejhorší prognózu ve smyslu vysokého rizika relapsu a nižšího celkového přežití mají pacienti s vysokou hladinou FLT3/ITD (FLT3/ITD/FLT3wt >50%) ve srovnání s pacienty

s nízkou hladinou FLT3/ITD nebo nemutovaným FLT3 [61]. Přes možnou příznivější prognózu nižší hladiny FLT3/ITD naopak některé studie dokladují rezistenci jakéhokoliv FLT3/ITD pozitivního klonu ke klasické chemoterapii a tím tedy trvajícímu vyššímu riziku relapsu AML [67]. S poznáním dalších mutací se zdá, že nepříznivý prognostický význam průkazu FLT3/ITD mutace může být ovlivněn přítomností dalších mutací např. TET2, MLL-PTD, DNMT3A atd. (viz.níže) [65].

NPM1 (Nucleophosmin 1):

NPM1 protein je nukleární protein, který má funkci chaperonu a podílí se též na přenosu látek mezi jádrem a cytoplasmou. NPM1 protein se podílí na zásadních buněčných funkcích, mezi které patří formace ribozomu, stabilizace onkosupresorového proteinu p14Arf v jádře, regulace duplikace centrozomu atd. NPM1 se tedy významně podílí na buněčné proliferaci a apoptóze [68].

Mutaci NPM1 genu u AML popsal v roce 2005 Brunangelo Falini a tato mutace patří k frekventním molekulárním mutacím, kdy je prokazována asi u 30% diagnostikovaných AML a asi u 50% AML s normálním cytogenetickým nálezem [69]. Podstatou mutace na molekulární úrovni je nejčastěji inserce 1 až 2 tetranukleotidů v oblasti exonu 12 mezi nukleotidy 956 až 971. Nejčastějším typem mutace NPM1 (typ A) je 960insTCTG, která představuje 80% případů [70]. Inserce nukleotidů v oblasti exonu 12 vede k prodloužení proteinu a ztrátě nukleární lokalizace proteinu a akumulace proteinu v cytoplasmě. K mutaci NPM1 genu na rozdíl např. od FLT3/ITD dochází časně v průběhu leukemogeneze, mutaci nese celá leukemická populace a nedochází ke ztrátě mutace v době relapsu, což činí NPM1 mutovaný gen vhodným markerem k monitoraci přítomnosti reziduální nemoci. Jak se podílí delokalizace proteinu NPM1 na kancerogeneze není zcela jasné. Jedná se zřejmě o kombinaci faktorů vyplývajících ze ztráty fyziologické funkce NPM1 proteinu a současně s nově získaných funkcí vzniklých delokalizací proteinu do cytoplasmy a možnou interakcí s dalšími cytoplasmatickými proteiny. Jednou z diskutovaných možností je aktivace onkogenu c-MYC při omezení funkce tumorsupresorového proteinu Arf vzniklé v důsledku mutace proteinu NPM1 [69,71].

Mutace NPM1 genu u AML významně ovlivňuje její prognózu, což dokladuje vytvoření provizorní diagnostické jednotky v rámci WHO klasifikace a současně zařazení průkazu NPM1 mutace mezi prognostická stratifikační kritéria v doporučeních evropské skupiny pro studium leukémií „European Leukemianet“ [2,32]. AML s NPM1 mutací je obvykle charakterizována leukocytózou a monocytární nebo myelomonocytární diferenciací, jenž dobře odpovídá na intenzivní cytostatickou léčbu (vysoké % KR AML) a v případě nepřítomnosti FLT3/ITD mutace pak při konsolidační léčbě vysokými dávkami cytosin arabinosidu dosahuje vyléčení u cca 60% pacientů (viz.tabulka 15), což je srovnatelné s výsledky cytostatické léčby u pacientů s příznivými cytogenetickými aberacemi a proto AML s NPM1 mutací bez přítomnosti FLT3/ITD patří k prognosticky příznivým AML [32,64, 72]. Nicméně nadále část pacientů s AML a mutací NPM1 genu neodpovídá uspokojivě na léčbu nebo jejich onemocnění relabuje a předpokládá se, že opět význam NPM1 mutace může být ovlivněn dalšími genetickými aberacemi (IDH1 apod.) [65].

Tabulka 15 - Vliv NPM1 mutace na výsledek léčby AML s normálním cytogenetickým nálezem a zohlednění přítomnosti FLT3/ITD [72]

	dosažení CR (%)	kumulativní incidence relapsu v 5 letech (%)	celkové přežití v 5 letech (%)
AML NPM1+/FLT3ITD-	61	30	50
AML NPM1+/FLT3ITD+	53	52	34
AML NPM1-/FLT3ITD+	50	58	27
AML NPM1-/FLT3ITD-	42	35	38

CEBP α (CCAAT/Enhancer Binding Protein α):

CEBP α je transkripční faktor, který je kritický pro vývoj myelopoézy a pro diferenciaci granulocytů a monocytů. CEBP α gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 19. Samotný protein je tvořen 358 aminokyselinami a jeho C-terminální doména umožňuje dimerizaci a následnou vazbu na DNA a N-terminální doména pak vede k aktivaci transkripce. V rámci hematopoézy je CEBP α exprimován v granulocytech, monocytech a eozinofilech. Jeho exprese byla též prokazována v hepatocytech, adipocytech a pneumocytech II.typu. Samotná transkripce CEBP α genu je vázána na aktivitu RUNX1 [73,74,75,76].

K ovlivnění funkce CEBP α dochází u AML dvěma způsoby. Jedná se jednak o inhibici jeho exprese, která typicky nastává u poruchy funkce RUNX1, což může nastat v případě delece či mutace RUNX1 genu nebo v rámci jeho translokace u cytogeneticky prognosticky příznivých AML s t(8;21) a inv(16), ale i u prognosticky nepříznivé AML s t(3;21) [77]. K nižší CEBP α expresi dochází též u AML s pozitivitou FLT3/ITD a též BCR-ABL fúzní protein, konstitucionálně aktivovaná intracelulární tyrosin kináza, vede k inhibici translace CEBP α mRNA [78,79]. Druhou příčinou ovlivnění funkce CEBP α je mutace genu CEBP α . K CEBP α mutaci dochází u cca 5-15% diagnostikovaných AML a u cca 10% AML s normálním karyotypem. Typicky se jedná o AML M1/M2 dle FAB klasifikace a typický imunofenotyp je: HLA-DR+, CD7+, CD153+, CD14-, CD15+, CD33+, CD34+ [80]. V případě CEBP α genu dochází ke dvěma typům somatických mutací. V oblasti N-terminální domény se jedná mutace vedoucí k předčasnému ukončení transkripce genu (truncating mutations) a v oblasti C-terminální domény pak dochází k mutacím měnícím čtecí rámec (frameshift mutations) [73,81]. Obvykle je přítomna bílelická mutace CEBP α [80,81]. Samotný průkaz bílelické mutace CEBP α genu u pacienta s AML a normálním karyotypem je pak příznivým prognostickým markerem a při léčbě samotnou chemoterapií včetně konsolidace vysokými dávkami cytosin arabinosidu jsou léčebné výsledky srovnatelné s výsledky pacientů s příznivými cytogenetickými aberacemi (viz.tabulka 16) [81,82,83]. V případě průkazu bílelické mutace CEBP α je současný průkaz NPM1 mutace spíše raritní a též přítomnost FLT3/ITD pozitivita je asi 2-4 x nižší než u jiných AML [83]. Prognóza pacientů s AML a bílelickou mutací CEBP α genu při současné přítomnosti pozitivita FLT3/ITD je zatím ne zcela jasně definována. Některé práce ukazují na příznivý prognostický význam bílelické CEBP α mutace bez ohledu na FLT3/ITD a některé naopak svědčí pro příznivou prognózu AML s bílelickou CEBP α mutací pouze v nepřítomnosti FLT3/ITD [81, 83, 84, 85, 86]. Bílelická mutace CEBP α genu u AML významně ovlivňuje její prognózu, což dokladuje vytvoření provizorní diagnostické jednotky v rámci WHO klasifikace a současně zařazení průkazu CEBP α mutace mezi prognostická stratifikační kritéria v doporučeních evropské skupiny pro studium

leukémií „European Leukemianet“ [2,32]. Zajímavostí je, že germinální CEBP α mutace v oblasti N-terminální domény je nalézána u pacientů s familiárním výskytem AML a progresse do AML je typicky spojena se somatickou mutací CEBP α v oblasti C-terminální domény. Důležitý je též fakt, že asi 10% pacientů s AML a mutací CEBP α nese terminální mutaci [82,84].

Tabulka 16 - Dosažení kompletní remise a dlouhodobé přežití při léčbě chemoterapií u AML s mutací CEBP α [84]

	AML s mutací CEBP α	AML bez CEBP α	p
Dosažení KR	92%	78%	0.002
5-leté přežití	63%	39%	0.0001

FLT3/ITD, mutace NPM1 a bialelická mutace CEBP α , jenž byly výše detailně popsány, patří k nejvíce studovaným molekulárně genetickým mutacím u AML a jejich význam se promítl do aktuálních diagnostických či prognostických kritérií [2,32].

U AML jsou však a to především v poslední době prokazovány další molekulárně genetické změny, u nichž zatím není jejich prognostický význam jasně definován a některé aktuální výzkumy ukazují, že příznivý či nepříznivý prognostický význam těchto mutací závisí na přítomnosti či nepřítomnosti dalších mutací [65]. K mutacím s ne zcela jednoznačným významem patří parciální tandemová duplikace MLL genu (MLL/PTD), která je diagnostikována asi u 5-10% AML s normálním karyotypem [87,88]. Mutace zahrnuje duplikaci části genomu mezi exony 5 až 11 MLL genu a jeho následnou insercí do intronu 4, což vede k elongaci proteinu. Nicméně nedochází k poškození funkční domény MLL proteinu a předpokládá se spíše vliv prostřednictvím inhibice zdravé MLL alely epigenetickými mechanismy [89]. Pacienti s AML a průkazem MLL/PTD mají kratší trvání remise ve srovnání s pacienty MLL/PTD negativními (7,75 měsíce vs. 19 měsíců, p 0.001) a též kratší přežití bez nemoci [87]. Vliv této mutace na celkové přežití je ne zcela jasný, ale jedna z posledních analýz ukazovala na nepříznivou prognózu nemocných s AML a pozitivitou MLL/PTD, která byla srovnatelná s pacienty s AML a nepříznivou cytogenetikou [65]. Publikovaná data však také nasvědčují, že tento nepříznivý vliv na celkové přežití může být překonán podáním vyšších dávek antracyklinu v rámci chemoterapie či zařazením aloTx do konsolidační léčby a případně využitím demetylačních léků [89]. KIT gen jenž kóduje receptor (CD117) patří k dalším genům, u kterých byla prokázána mutace u AML. KIT mutace typicky postihuje exon 7 a 8 genu a nejčastější mutací je substituce D816V [90]. KIT mutace je frekventně (15-20%) prokazována u AML s t(8;21) a AML s inv 16. Pacienti s KIT mutací mají vyšší leukocytózu a častěji zastižené extramedulární postižení AML v oblasti paraspinální. Mutace KIT genu nepříznivě ovlivňuje prognózu pacientů s AML s t(8;21) a inv(16) léčených samotnou chemoterapií [91,92,93]. Další skupinou genů jsou geny, jenž ovlivňují metylaci DNA a jejichž mutace se podílí na rozvoji AML epigenetickými mechanismy. K těmto genům patří gen kódující enzym izocitrátdehydrogenázu 1 nebo 2 (IDH1/2). Mutace genu IDH1/2 je prokazována asi u 15-33% AML a často je prokazována u AML s mutací NPM1 a FLT3 [94,95]. Dysfunkce enzymu vede ke kumulaci D-stereoizomeru 2-hydroxyglutarátu v nádorových buňkách, což vede k interferenci s demetylázami např. TET2. Nicméně

prognostický význam průkazu mutace IDH1/2 je kontroverzní. Některé studie prokazují nepříznivý prognostický význam [94,95]. Naopak další studie prokazují příznivý nebo žádný prognostický význam [96,97]. K dalším genům, jenž ovlivňují metylaci DNA a histonů a jejichž mutace byla prokázána u AML, patří gen kódující enzym DNA-metyltransferázu 3A (DNMT3A). Mutace genu DNMT3A může vést k hypermetylaci některých tumor supresorových genů a tím se podílet na vzniku AML [98]. Mutace DNMT3A je prokazována u 22% AML a asi u 36% AML s normálním karyotypem. Mutace DNMT3A je často prokazována u AML s monocytoidní diferenciací, extrémní leukocytózou a u starších nemocných. Současně je frekventně spojena s FLT3/ITD nebo mutací NPM1 [99,100]. Přestože je mutace genu DNMT3A často spojena s dalšími aberacemi několik multivariantních analýz doložilo její statisticky nepříznivý prognostický význam a to i v rámci pacientů s prokazovanou nepříznivou FLT3/ITD, kde přítomnost mutace DNMT3A dále zhoršuje již tak nepříznivou prognózu [65,101,102]. Některé práce pak dokladují zlepšení prognózy AML s prokazovanou mutací DNMT3A v případě použití vyšších dávek antracyklinů v rámci intenzivní cytostatické léčby nebo při použití hypometylačních látek [65,103]. Mezi další geny ovlivňující metylaci a jejichž mutace byla prokázána u AML patří gen kódující TET2 (ten-eleven translocation) protein. Mutace TET2 genu je popisována u 18-23% pacientů s AML a normální cytogenetikou. Průkaz TET2 mutace je pak prognosticky nepříznivým markerem a u FLT3/ITD pozitivních i negativních AML a je doporučováno v rámci konsolidační léčby zařazení aloTx [65]. K dalším genům, jenž se podílí na hematopoéze a jehož mutace je prokazována u AML je WT1 (Wilms tumor 1) gen. Zvýšená exprese WT1 genu, která je prokazována u 73-93% AML [106,107,108] je využívána již roky v monitoraci MRN [107,109,110]. Současně probíhaly snahy o zhodnocení prognostického významu zvýšené exprese WT1 genu v době stanovení diagnózy AML [111]. Prognostický význam mutace WT1 genu, která byla poprvé popsána v roce 1994, byl zkoumán až v posledních letech. WT1 gen se v případě normální funkce v rámci hematopoézy podílí na regulaci buněčného přežití, proliferaci a diferenciaci [112]. Mutace WT1 genu je prokazována asi u 10% AML a některé práce dokládají nepříznivý prognostický význam průkazu WT1 mutace na celkové přežití, ale další publikovaná data tento význam nepotvrdily [113,114,115,116]. Kromě výše zmíněných genů, jejichž mutace jsou prokazovány u AML a u kterých byl detailněji zkoumán jejich prognostický význam, však existuje řada dalších genů, jejichž mutace je v různých frekvencích u AML detekována. Mezi tyto geny, u kterých probíhá další výzkum jejich významu patří mj. geny RUNX1, ASXL1, NRAS, C-CBL, PTPN11, UTX, PHF6 a další. Průkaz genových mutací má však zřejmě mnohem komplexnější charakter. Jak již bylo výše uvedeno u AML je v řadě případů prokazováno více mutací a jejich kombinace pak ovlivňuje výše uvedený význam každé jednotlivě prokazované mutace. V roce 2012 pak byla publikována dosud nejkompexnější studie, která se zaměřila na význam kombinací jednotlivých mutací [64]. U 398 pacientů s nově diagnostikovanou AML léčených uniformně v rámci studie ECOG E1900 bylo provedeno vyšetření na přítomnost mutace u 18 genů. V rámci této skupiny pacientů na základě cytogenetického vyšetření mělo 63% z nich intermediární cytogenetickou prognózu a jejich 3 leté celkové přežití bylo 36%. 19% pacientů mělo cytogeneticky příznivý prognostický nálezn a jejich 3 leté celkové přežití bylo 58%. 18% pacientů pak mělo nepříznivou cytogenetickou prognózu s 3 letým celkovým přežitím 11%. Mutační analýza pak umožnila v rámci intermediární prognostické skupiny rozlišit 3 skupiny nemocných, z nichž část měla prognózu příznivou srovnatelnou se skupinou pacientů

s cytogenetickým příznivým nálezem, část měla prognózu intermediární a část pak prognózu nepříznivou opět srovnatelnou se skupinou nemocných s nepříznivým cytogenetickým nálezem (viz. tabulka 17).

Tabulka 17 - Prognostické rozdělení pacientů s normální nebo intermediární cytogenetickou prognózou na základě přítomnosti genových mutací a jejich kombinací [64]

Cytogenetika	Mutace		Prognóza
Příznivá	Jakákoliv		Příznivá
normální nebo intermediární	FLT3-ITD negat.	mutované : NPM1 + IDH1 nebo IDH2	
	FLT3-ITD negat.	nemutované: ASXL1, MLL-PTD, PHF6, TET2	Intermediární
	FLT3-ITD negat nebo pozit.	mutovaný: CEBPa	
	FLT3-ITD pozit.	nemutované: MLL-PTD, TET2, DNMT3A a nepřítomnost trisomie chr. 8	
	FLT3-ITD negat.	mutované : TET2, MLL-PTD, ASXL1, PHF6	Špatná
	FLT3-ITD pozit.	mutované: TET2, MLL-PTD, DNMT3A, trisomie chr. 8 nemutovaný: CEBPa	
Nepříznivá	Jakákoliv		

Kromě samotných genových mutací byl též hodnocen význam zvýšené exprese genů v době diagnostiky AML na prognózu onemocnění. Ke genům, jenž byly v této souvislosti nejpodrobněji hodnoceny, patří BAALC (brain and leukemia cytoplasmic) gen. BAALC gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 8 a jeho produktem je protein s ne zcela jasnou funkcí, u něhož se předpokládá podíl na vývoji neuroektodermu a hemopoézy [117]. Zvýšená exprese BAALC genu byla zjištěna u AML, kdy se předpokládá, že při zvýšené aktivaci BAALC genu dochází poruše diferenciaci a v kooperaci s onkogenem HoxA9 k rozvoji leukemogeneze [118,119]. Zvýšená exprese BAALC genu je u pacientů s AML a normálním karyotypem spojena s nižší šancí na dosažení remise onemocnění a dlouhodobé přežití [118,120]. Nově je též dokladováno, že BAALC exprese ovlivňuje prognózu i u AML s příznivou či nepříznivou prognózou (viz. tabulka 18)[121].

Tabulka 18 - Význam zvýšené exprese BAALC u jednotlivých cytogenetických prognostických skupin [121]

cytogenetika	BAALC exprese	3 leté celkové přežití (%)
příznivá	Nízká	100
	Vysoká	71
intermediární	Nízká	55
	Vysoká	40
nepříznivá	Nízká	34
	Vysoká	23

Dalším genem, jehož zvýšená exprese byla prokázána u části AML je MN1 (meningeoma 1) gen. MN1 gen je lokalizován na chromozomu 22 a na myších modelech byl prokázán jeho podíl na leukemogenezy v kooperaci s fúzním genem

CBF β -MYH11 nebo genem HoxA9 [122,123]. Zvýšená exprese MN1 genu je spojena s nepříznivou prognózou u AML s normálním cytogenetickým nálezem [124]. Podobně jako u zvýšené exprese BAALC genu bylo dokladováno, že MN1 exprese ovlivňuje i prognózu pacientů s AML s příznivou a nepříznivou cytogenetikou (viz. tabulka 19). [125]

Tabulka 19 - Význam zvýšené exprese MN1 genu u jednotlivých cytogenetických prognostických skupin [125]

cytogenetika	MN1 exprese	2 leté celkové přežití (%)
příznivá	Nízká	62
	Vysoká	26
intermediární	Nízká	53
	Vysoká	26
nepříznivá	Nízká	50
	Vysoká	18

ERG (ETS-related gene) patří k dalším genům, jejichž zvýšená exprese byla prokázána u AML [126]. ERG se společně s dalšími členy ETS rodiny podílí na regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy [127]. ERG je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 21 v oblasti, u které je při cytogenetickém nebo molekulárně genetickém vyšetření často prokazována přestavba např. u AML, Ewingova sarkomu či karcinomu prostaty [128]. Zvýšená exprese ERG je často prokazována u AML s komplexními změnami karyotypu, u AML s kryptickou amplifikací chromozómu 21 a často také u AML s normálním karyotypem, kde byla zvýšená exprese ERG genu statisticky signifikantně spojena s horší prognózou AML [126,129]. Podobně jako u genových mutací se zdá, že na základě publikovaných dat, je význam zvýšené ERG exprese spojen s přítomností dalších molekulárních mutací [128], kdy bylo zjištěno, že v případě pozitivitu FLT3/ITD nemá zvýšená exprese ERG další prognostický význam na rozdíl od pacientů bez FLT3/ITD, kdy zvýšená exprese ERG zhoršuje jejich šanci na dosažení remise i dlouhodobé přežití a podobná situace byla statisticky doložena i u příznivé prognostické skupiny pacientů s AML a mutací NPM1 genu, kde ti nemocní s vyšší expresí ERG měli opět nižší šanci na dosažení KR AML a na dosažení dlouhodobého přežití ve srovnání s pacienty s AML a mutací NPM1 genu bez zvýšené exprese ERG. K dalším podrobněji zkoumaným genům, jejichž zvýšená exprese byla prokázána u AML patří EVI1 (Ecotropic viral integration site 1) gen. Zvýšená exprese EVI1 genu je prokazována asi u 8% nově diagnostikovaných AML. Typicky dochází ke zvýšené expresi EVI1 genu u AML s cytogenetickým nálezem inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2), ale zvýšená exprese genu je prokazována i u AML bez tohoto cytogenetického nálezu včetně AML s normálním karyotypem [130]. Několik publikovaných prací dokladovalo nepříznivý prognostický význam zvýšené exprese EVI1 genu [130,131,132]. Dosud nejrozsáhlejší publikovaná data dokladují prognosticky nepříznivý význam vysoké exprese EVI1 genu. Multivariátní analýza prokázala nepříznivý vliv vysoké EVI1 exprese na dosažení KR AML (EVI1+ 53% vs. EVI1- 77%) a přežití bez relapsu. Vliv vysoké exprese EVI1 genu na celkové přežití však prokázáno nebylo. Současně publikovaná data ukazují zlepšení nepříznivé prognózy pacientů s AML a vysokou expresí EVI1 genu, kteří v KR podstoupili aloTx

ve srovnání s pacienty, kteří byli léčeni chemoterapií nebo autologní transplantací (3 leté celkové přežití 50% vs. 25%) [133].

Výše uvedený přehled genových mutací či zvýšené exprese jednotlivých genů a jejich potenciální prognostický význam není úplný a v současnosti je zkoumána řada dalších molekulárních genových markerů (ASXL1, PHF6, HRAS, KRAS, NRAS, PTEN atd.), ale jejich prognostický význam je zatím sporný či rozsah publikovaných výsledků prozatím velmi omezený.

5. **Minimální reziduální nemoc:**

Výše uvedené „vstupní“ prognostické markery související s AML mohou upřesnit a do značné míry upřesňují prognózu nově diagnostikované AML a současně mohou pomoci k volbě správné strategie léčby AML. Nicméně některé z výše uvedených prognostických parametrů mohou být příliš obecné a u některých pak jejich prognostický význam není dostatečně silný nebo dokonce definitivně verifikovaný. Význam těchto prognostických markerů může upřesnit další „biologický“ faktor a to samotná odpověď na podanou chemoterapii. Tento faktor pak může pomoci dále prognosticky rozdělit pacienty i v rámci vstupně definované prognostické skupiny, což může dále pomoci ve volbě ideální léčebné strategie. Léčebnou odpověď (viz. též další kapitola) můžeme pro zjednodušení rozdělit na klasickou „mikroskopickou“ odpověď tzn. odpověď, která je hodnocena v rámci etablovaných kritérií léčebné odpovědi [134] a na odpověď „submikroskopickou“, kdy na základě speciálních vyšetřovacích technik jsme schopni detekovat případnou přítomnost reziduální populace blastů s citlivostí až $1:10^6$ tzv. minimální reziduální nemoc (MRN).

V rámci standardních kritérií léčebné odpovědi je dosažení KR AML nezávislým příznivým prognostickým faktorem. Dle publikovaných dat nedosažení méně než 15% blastů po prvním indukčním cyklu léčby nebo méně než 5% blastů v kostní dřeni po dvou indukčních cyklech chemoterapie je spojeno s vysoce nepříznivou prognózou AML a v podstatě jen provedení aloTx může dosáhnout dlouhodobé kontroly AML alespoň u části nemocných s neuspokojivou odpovědí na úvodní léčbu [135]. Podobně význam morfologické tedy mikroskopické odpovědi podporují další publikovaná data, která dokládají, že nedosažení časné odpovědi ve smyslu vymizení leukemických blastů v kostní dřeni v průběhu indukční léčby je spojeno s nižší šancí na dosažení KR AML a dlouhodobé kontroly AML [136]. Přes svůj nezpochybnitelný prognostický význam je však pouhé morfologické hodnocení léčebné odpovědi zatíženo určitou mírou subjektivity a pak především poměrně nízkou citlivostí ve smyslu průkazu zbytkové nemoci.

Díky laboratorním metodám a to v současné době především PCR a multiparametrové průtokové cytometrii, které jsou dále zkvalitňovány, standardizovány a validovány, lze dosáhnout detekce reziduální populace blastů na mnohem nižších hladinách než klasickou morfologií a uvedená hlubší detekce MRN nabízí bližší stratifikaci AML. Nicméně zatím s výjimkou akutní promyelocytární leukémie [137] nejsou výsledky detekce MRN součástí standardních léčebných doporučení, i když publikovaná data stále více podporují význam stanovení MRN u AML. K definitivnímu zařazení stanovení MRN do léčebných schémat je nutné finálně definovat odpovědi na tyto otázky: co by mělo být monitorováno, jaká metodika by měla být použita, zda je použitá metodika standardizována mezi laboratořemi, jak definovat prognostické hladiny, kdy

má být minimální rezidální nemoc monitorována a jaké máme léčebné možnosti u pacientů s prokazovanou MRN [138]. K uvedeným otázkám prozatím chybí definitivní odpovědi, které by umožnili zařazení výsledků stanovení MRN do léčebných algoritmů u AML, ale dosud publikovaná data již alespoň částečně ukazují na zásadní význam monitorace MRN u AML.

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)

K molekulárním markerům AML, které umožňují monitoraci MRN s citlivostí $1:10^5$ - 10^6 pomocí RT-PCR patří fúzní geny (RUNX1-RUNX1T1, CBF β -MYH11 atd.). Právě v případě AML s příznivou prognózou tzn. AML s t(8;21) nebo s inv(16) či t(16;16) tzn. fúzními geny RUNX1-RUNX1T1, CBF β -MYH11 lze očekávat při léčbě samotnou chemoterapií asi 60-70% pravděpodobnost dlouhodobé kontroly AML. Nicméně část pacientů přes příznivou prognózu této skupiny AML relabuje a stanovení a monitorace MRN by mohla v tomto případě pomoci definovat část pacientů, u nichž standardní samotná chemoterapie bude spojena s vyššími riziky selhání léčby a tito pacienti by mohli být i přes obecně příznivou prognózu „své“ AML indikováni k aloTx, případně k časné léčebné intervenci. Dosud publikovaná data u tohoto typu leukémií uvedené předpoklady podporují [139,140]. Výsledky monitorace pomocí RT-PCR u 278 pacientů s AML s t(8;21) nebo inv(16)/t(16;16) léčených v rámci studie MRC AML-15 ukázaly, že pokles MRN po indukční léčbě predikuje riziko relapsu AML (viz.tabulka 20 a 21), podobně jako pokles MRN po dalších cyklech chemoterapie. V rámci monitorace MRN po ukončení léčby AML byl doložen význam hladiny prokazované MRN na riziko relapsu i celkové přežití (viz.tabulka 22 a 23) [140].

Tabulka 20 - Kumulativní riziko relapsu u AML s t(8;21) dle poklesu hladiny MRN po indukčním cyklu léčby [140]

Pokles MRN vyšetřením z BM	Kumulativní incidence relapsu
< 1 log	100%
1-2 log	42%
2-3 log	30%
>3 log	4%

Tabulka 21 - Kumulativní riziko relapsu u AML s inv(16)/t(16;16) dle poklesu hladiny MRN po indukčním cyklu léčby [140]

MRN vyšetřením z PB	Kumulativní incidence relapsu
> 500 kopií	100%
10-500 kopií	56%
< 10 kopií	21%

Tabulka 22 - Riziko relapsu a celkové přežití u AML s t(8;21) dle hladiny MRN po ukončení léčby a v průběhu další monitorace cyklu léčby [140]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu	Předpokládané přežití
> 500 kopií	100%	57%
< 500 kopií	7%	94%

Tabulka 23 - Riziko relapsu a celkové přežití u AML s inv(16)/t(16;16) dle hladiny MRN po ukončení léčby a v průběhu další monitorace cyklu léčby [140]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu	Předpokládané přežití
> 50 kopií	100%	25%
< 50 kopií	10%	100%

Pomocí fúzních genů lze monitorovat MRN u maximálně 25% AML. Využití monitorace MRN pomocí RT-PCR rozšiřuje možnost kvantifikace dalších molekulárních mutací prokazovaných u AML (FLT3/ITD, NPM1, MLL/PTD, DNMT3A atd.) s podobnou hloubkou citlivosti jako u fúzních genů. Nicméně zde hraje klíčovou roli stabilita dané mutace v průběhu onemocnění, kdy například v případě využití FLT3/ITD je dokumentována velká nestabilita při srovnání výsledků z doby diagnózy AML a relapsu AML [141,142]. Podobně může být problematická monitorace MRN pomocí MLL/PTD, protože na nízkých hladinách je uvedená mutace prokazována u téměř většiny zdravých lidí [143]. Naopak monitorace frekventní (40-60% AML s normálním karyotypem) mutace NPM1 genu se jeví díky stabilitě mutace a vysoké expresi mutovaného NPM1 genu jako ideální marker pro monitoraci MRN pomocí RT-PCR u AML [144]. Řada publikovaných prací pak dokládala význam monitorace NPM1 mutace k upřesnění prognózy AML s mutací NPM1 genu [144,145,146,147]. Průkaz NPM1 mutace po skončení indukční fáze léčby, po skončení konsolidace a průkaz více než 2% NPM1/ABL v průběhu následné monitorace byl hodnocen jako nejsilnější nezávislý prognostický faktor pro riziko relapsu a celkové přežití u AML s NPM1 mutací (viz. tabulka 25, 26, 27) [146].

Tabulka 25 - Riziko relapsu a celkové přežití u AML s NPM1 mutací dle hladiny MRN po ukončení indukční léčby [146]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu	Předpokládané přežití
NPM1 negat.	6,4%	87%
NPM1 pozit.	53,0%	41%

Tabulka 26 - Riziko relapsu a celkové přežití u AML s NPM1 mutací dle hladiny MRN po ukončení konsolidační léčby [146]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu	Předpokládané přežití
NPM1 negat.	15,7%	80%
NPM1 pozit.	66,5%	44%

Tabulka 27 - Riziko relapsu u AML s NPM1 mutací dle hladiny MRN v průběhu monitorace po ukončení konsolidační léčby [146]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu
< 200 kopií NPM1 /10000 kopií ABL	0%
> 200 kopií NPM1 /10000 kopií ABL	100%

Kromě využití kvantifikace fúzních genů či kvantifikace vybraných pro leukémii specifických genových mutací lze k monitoraci MRN pomocí RT-PCR u AML využít i genů, u kterých je v době diagnózy AML prokazována jejich zvýšená exprese (WT1, BAALC, atd.). Na rozdíl od výše uvedených možností v případě sledování exprese genů je stanovení MRN limitováno nižší senzitivitou, protože uvedené geny jsou v malém množství prokazovány i u zdravých jedinců. I přes tuto limitaci publikovaná data dokladují, že monitorace zvýšené exprese genů pomocí RT-PCR umožňuje predikovat riziko relapsu a dlouhodobé přežití u AML [109,148,149,150]. Nejvíce publikovaných prací je věnováno významu exprese WT1 v genu, který je navíc široce využitelný pro monitoraci MRN u více než 70% AML [151]. Využitím standardizované metodiky RT-PCR v rámci projektu evropské skupiny pro studium leukémií „European Leukemianet“ byl pokles exprese WT1 genu o 2 řády po indukční léčbě vyhodnocen jako nezávislý prognostický faktor pro riziko relapsu (viz tabulka 28). Podobně průkaz nad normu zvýšeného počtu kopií WT1 genu vyšetřením z kostní dřeně (>250 kopií WT1 genu/10000 kopií ABL genu) nebo periferní krve (>50 kopií WT1 genu/10000 kopií ABL genu) těsně po skončení konsolidační léčby nezávisle predikoval riziko následného relapsu (viz tabulka 29) [149].

Tabulka 28 - Kumulativní riziko relapsu u AML dle poklesu hladiny exprese WT1 genu po indukční léčbě [148]

Pokles MRN vyšetřením z PB či BM	Kumulativní incidence relapsu
> 2 log	40%
< 2 log	75%

Tabulka 29 - Kumulativní riziko relapsu u AML dle hladiny exprese WT1 genu těsně po skončení konsolidační léčby [148]

Pokles MRN vyšetřením z PB či BM	Kumulativní incidence relapsu
> 2 log	40%
< 2 log	75%

Multiparametrová průtoková cytometrie (MFCM)

MFCM je další senzitivní vyšetřovací metodou, která může být a je využívána k detekci submikroskopické MRN u pacientů s AML. Její výhodou oproti RT-PCR, která je

nejsenzitivnějším způsobem detekce MRN limitovaným však využitelností jen u cca 50-60% AML, je možnost využití u více než 80% nemocných s AML. K dalším výhodám MFCM patří možnost relativně rychlého provedení a získání výsledků, rozlišení mrtvých a živých buněk a uspokojujivá senzitivita. Monitorace MRN pomocí MFCM využívá detekce patologické exprese povrchových antigenů na leukemických buňkách a jejich kombinace. Patologická kombinace znaků na leukemických buňkách se nazývá imunofenotypem asociovaným s leukémií. Právě využití současné detekce několika různých antigenů na jedné buňce díky MFCM umožňuje dosažení citlivosti metodiky 1:10000-100000 [138,152]. Určitou limitací MFCM je skutečnost, že v době diagnózy je v případě AML detekováno často několik patologických s leukémií spojených imunofenotypů a v rámci monitorace MRN je třeba vyšetření všech vstupních patologických klonů k minimalizaci nepřesných výsledků a to i vzhledem ke skutečnosti, že v případě relabující AML může dojít u části případů ke změně vstupního patologického imunofenotypu [153,154]. Podobně jako u monitorace MRN pomocí RT-PCR publikované práce dokládají prognostický význam stanovení MRN využitím MFCM ke zhodnocení rizika relapsu a šance na dlouhodobé přežití nemocných s AML [155,156,157]. Například práce hodnotící MRN u AML pomocí MFCM u 100 uniformně léčených pacientů doložila nezávislý statistický prognostický význam MRN v období po indukci a po konsolidaci ve smyslu predikce přežití bez relapsu a celkového přežití (viz.tabulka 30, 31). Důležitým a zajímavým zjištěním této práce byl též fakt, že pacienti, kteří měli po indukci detekovanou MRN s následnou její negativitou po konsolidaci měli srovnatelné přežití bez relapsu a celkové přežití jako pacienti s negativní MRN již po indukční léčbě [157].

Tabulka 30 - 5 leté přežití bez relapsu a celkové přežití u AML dle positivity či negativity MRN (limit 0,035%) za využití její detekce pomocí MFCM po skončení indukční léčby [157]

Hladina MRN (BM)	Přežití bez relapsu	Celkové přežití
MRN negat.	51%	48%
MRN pozit.	22%	25%

Tabulka 31 - 5 leté přežití bez relapsu a celkové přežití u AML dle positivity či negativity MRN (limit 0,035%) za využití její detekce pomocí MFCM po skončení konsolidační léčby [157]

Hladina MRN (BM)	Přežití bez relapsu	Celkové přežití
MRN negat.	71%	64%
MRN pozit.	13%	16%

MFCM rovněž umožňuje detekci leukemických kmenových buněk na základě jejich atypické exprese některých antigenů (CD 123, CLL-1 atd.) v CD34+/CD38- populaci normálních krvetvorných kmenových buněk. Jejich vstupní zastoupení a průkaz po ukončení chemoterapie může predikovat též riziko relapsu AML [154,158,159].

2.7 Léčba AML

Princípem kurativní léčby AML je v současné době navození stavu remise onemocnění pomocí intenzivní cytostatické léčby a následná konsolidační léčba pomocí dalších cyklů intenzivní chemoterapie s případným zařazením aloTx, která má za úkol udržet dlouhodobou remisi onemocnění. Zmíněná intenzivní chemoterapie musí být vzhledem k rizikům z ní vyplývajících zajištěna kvalitní podpůrnou léčbou, která je tedy nedílnou součástí intenzivní léčby AML a její kvalita významně ovlivňuje dosažené léčebné výsledky. Část pacientů, jejichž celkový stav nebo další přidružená onemocnění neumožňuje podstoupit intenzivní chemoterapii, je léčena paliativně. Paliativní léčbou je myšlena kvalitní podpůrná léčba s případným podáním nižších dávek cytostatik, což může vést alespoň k prodloužení života paliativně léčeného pacienta s AML v řádu týdnů či měsíců. Ideálně by měli být pacienti neindikovaní ke kurativní léčbě zařazeni do klinických studií zkoušející nové léčebné modalit v terapii AML. Bohužel nové léky v případě AML na rozdíl od jiných hematologických maligních onemocnění (chronické leukémie, lymfomy, mnohočetný myelom) zatím zásadně nezlepšily prognózu AML a nestaly se rutinními léčebnými modalitami v terapii AML.

2.7.1 Hodnocení léčebné odpovědi

V případě kurativní léčby nádorového onemocnění je ke zhodnocení účinnosti léčby nutná definice léčebných odpovědí. Podobně je tomu u AML, kde byla publikována obecně akceptovaná kritéria léčebné odpovědi [134]. Uvedená kritéria léčebné odpovědi definují léčebnou odpověď na kompletní (KR) a parciální remisi (PR). Dále definují kvalitu léčebné odpovědi v případě dosažení KR AML na cytogenetickou remisi. Naopak blíže nespecifikují kvalitu léčebné odpovědi za použití nových technik a termín imunofenotypická nebo molekulární remise AML závisí na sledovaných markerech a použité metodice. Publikovaná kritéria též definují selhání léčby do kategorií rezistentní onemocnění, úmrtí v době aplázie kostní dřeně po chemoterapii a úmrtí v průběhu chemoterapie nebo méně než 7 dní po jejím ukončení hodnotí jako úmrtí z nejasné příčiny. Součástí kritérií je i definice relapsu opět pouze na mikroskopické úrovni (viz tabulka 32).

Tabulka 32 - Kritéria léčebné odpovědi u AML [134]

Kategorie	Definice
Kompletní remise (KR)	blasty v kostní dřeni < 5%; chybění blastů s Auerovými tyčemi; nepřítomnost extramedulárního postižení, počet neutrofilů > 1x10 ⁹ /l; počet trombocytů > 100x10 ⁹ /l; nezávislost na transfúzích erytrocytů
Kompletní remise s inkompletní reparací krevního obrazu (KRi)	kritéria jako u KR, kromě reziduální neutropénie nebo trombopénie
Morfologický „leukemia-free state“	blasty v kostní dřeni < 5%; chybění blastů s Auerovými tyčemi; nepřítomnost extramedulárního postižení; není požadována reparace hodnot krevního obrazu
Parciální remise (PR)	všechna hematologická kritéria KR; počet blastů v kostní dřeni 5-25% a pokles oproti stavu před léčbou o > 50%
Cytogenetická kompletní remise (KRc)	normalizace karyotypu v době morfologické KR nebo KRi v případech abnormálního karyotypu v době diagnózy+ nutno vyšetřit minimálně 20 metafází
Molekulární remise (KRm)	bez jednoznačné definice ; záleží na monitorovaném markeru
Rezistentní onemocnění (RO)	Nedosažení KR nebo KRi, eventuálně PR; týká se pouze pacientů, kteří žijí ≥ 7 dní po skončení léčby a je dokladováno z krevního obrazu či kostní dřeni perzistence leukémie

Smrt v aplázii	smrt ≥ 7 dní po ukončení léčby v cytopénie a s vyšetřením kostní dřeně v rozsahu 7 dnů před úmrtí s dokladem aplázie a nepřítomnosti leukemické infiltrace
Smrt z nejasné příčiny	smrt během chemoterapie a do 7 dnů od skončení léčby; bez přítomnosti blastů v periferní krvi a bez dostupného vyšetření kostní dřeně
Relaps	blasty v kostní dřeně $\geq 5\%$; znovuobjevení blastů v periferní krvi nebo rozvoj extramedulárního postižení

Ke zhodnocení léčebné odpovědi se přistupuje v případě konvenční indukční léčby „3+7“ obvykle mezi dny 21 až 28 od zahájení podávání chemoterapie. V rámci některých studií hodnotících rychlost účinku terapie nebo v případě intenzifikované indukční strategie je prováděno hodnocení 7 až 10 dnů od zahájení indukční léčby [33]. Kromě odpovědi na indukční léčbu je samozřejmě nutná další monitorace AML v průběhu a po skončení následné konsolidační léčby. Frekvence a způsob monitorace se může lišit v rámci klinických studií, kdy je doporučováno vyšetření kostní dřeně každé 3 měsíce v prvních 2 letech po skončení léčby a dále každých 6 měsíců v průběhu dalších 2-3 let, a léčby podávané mimo klinické studie, kdy může být monitorace modifikována a kdy není chybou případné kontrolní vyšetření kostní dřeně provedené pouze v případě rozvoje abnormalit v krevním obraze [33]. Ke zhodnocení dlouhodobé účinnosti léčby jsou pak definovány intervaly přežití (viz. tabulka 33) [33]

Tabulka 33 - Kritéria přežití pacientů s AML [33]

Kategorie	Definice
Celkové přežití (OS)	doba od dg. či zahájení léčby do data úmrtí z jakékoliv příčiny; u pacientů, u nichž není známo, zda zemřeli jsou data vyhodnocována k poslednímu datu, kdy byli naživu
Přežití bez relapsu (RFS)	doba od dosažení remise do relapsu nebo úmrtí z jakékoliv příčiny; u pacientů, u nichž není známo, zda zrelabovali či zemřeli jsou data vyhodnocována k poslednímu datu vyšetření
Přežití bez události (EFS)	doba od dg. či zahájení léčby do data selhání indukční léčby, relapsu po dosažení KR nebo úmrtí z jakékoliv příčiny; u pacientů, u nichž není známo, zda zemřeli jsou data vyhodnocována k poslednímu datu vyšetření

2.7.2 Kurativní (intenzivní) cytostatická léčba AML

Jak bylo výše uvedeno, kurativní léčba AML sestává z intenzivní indukční cytostatické léčby, jenž má za cíl navození remise onemocnění a následně intenzivní konsolidační cytostatické léčby, jenž je případně doplněna aloTx a jejímž cílem je trvalé udržení navozené KR AML. Kurativní léčebná strategie se v současné době liší u pacientů starších a mladších 60 let.

1. Kurativní léčba u nemocných mladších 60 let

Indukční léčba v kombinaci 3 denní intravenózní aplikace antracyklinu a současné 7 denní kontinuální infúze cytosin arabinosidu zůstává i 30 let po zavedení v současnosti „zlatým“ standardem indukční léčby [160]. Aktuálně tedy nadále patří k obecně užívaným a doporučovaným indukčním intenzivním protokolům kombinace 3 dnů daunorubicinu (minimálně 60mg/m²/den) případně idarubicinu (10-12 mg/m²/den) eventuálně mitoxantronu (10-12mg/m²/den) v kombinaci s 7 denní kontinuální infúzní aplikací cytosin arabinosidu (100-200 mg/m²/den) [33]. Uvedená indukční léčba dosahuje u pacientů mladších 60 let s AML zhruba 70% úspěšnosti dosažení KR. Samozřejmě v posledních 30 letech proběhla celá řada randomizovaných studií, které si

kladly za cíl zlepšení četnosti a kvality léčebné odpovědi a tím i zlepšení celkového přežití. Bohužel ať už náhrada daunorubicinu jiným lékem [161,162,163], doplnění dalšího cytostatika případně léku ovlivňující funkci P-glykoproteinu (multidrug resistance protein) [164,165,166] nebo využití vysokých dávek cytosin arabinosidu [167,168] v rámci indukční léčby nevedlo k jednoznačnému zlepšení výsledků léčby. Využití růstových faktorů granulopoezy ke zvýšení senzitivity leukemických blastů k podaným cytostatikům mělo v některých studiích vliv na zlepšení přežití bez relapsu i celkové přežití [169,170], nicméně některé práce tento vliv nepotvrdily [171] a využití růstových faktorů nadále zůstává předmětem dalšího zkoumání. Nicméně v posledních letech výsledky některých publikací naznačují možnost zlepšení výsledků indukční léčby minimálně pro některé skupiny pacientů. Vyšší dávky daunorubicinu (90 mg/m²/den) zřejmě mohou zlepšit prognózu pacientů s AML a přítomností některých nepříznivých molekulárně genetických aberací (DNMT3A, MLL/PTD) [65]. Podobně doplnění indukční léčby o cladribin vedlo v rámci polské randomizované studie ke zlepšení léčebných výsledků a to především pro pacienty ve věku 50-60 let s nepříznivou prognózou AML [172]. K určitému zlepšení léčebných výsledků, které však čeká na své další potvrzení, vedlo zařazení nových léků (cílených léků) do indukčních protokolů. Vzhledem k zatím pouze jejich experimentálnímu využití budou tyto výsledky zmíněny níže v kapitole nových léčebných postupů.

Po dosažení KR AML by téměř všichni pacienti bez další léčby zrelabovali, a proto je další léčba nezbytná k udržení remise AML [173]. V rámci konsolidační léčby pak byla u pacientů s AML zkoumána řada léčebných přístupů zahrnujících konvenční intenzivní chemoterapii, dlouhodobou udržovací terapii, vysocedávkovanou léčbu cytosin arabinosidem, zařazení autologní či alogenní transplantace. V současnosti je obecně doporučovaným přístupem podání vysokých dávek cytosin arabinosidu (3000 mg/m² 6x ve 12 hodinových intervalech) v rámci 3-4 cyklů konsolidační léčby. Jiné cytostatické léčebné protokoly nedoložily zlepšení výsledků ve srovnání s podáním vysokých dávek cytosin arabinosidu [174,175,176]. Aplikace vysocedávkovaného cytosin arabinosidu v rámci konsolidační léčby však zlepšuje prognózu onemocnění především u pacientů s AML a příznivými prognostickými markery. Publikovaná data doložila, že pacienti s AML a t(8;21) nebo inv(16)/t(16;16) profitují z podání 2 a více konsolidačních cyklů vysocedávkovaného cytosin arabinosidu a že u uvedených typů AML případné provedení autologní nebo alogenní transplantace v rámci konsolidační léčby nezlepšuje léčebné výsledky (viz. tabulka 34) [41,177,178,179].

Tabulka 34 - Srovnání léčebných výsledků transplantace a chemoterapie u AML s t(8;21) [179]

	chemoterapie	alogenní transplantace	P
TRM	6%	32%	< 0.001
Relaps	29%	14%	0.015
RFS	64%	55%	0.24

V rámci uvedené skupiny nemocných s AML a t(8;21) či inv(16)/t(16;16) je však přítomna skupina pacientů, u nichž je prokazována mutace c-kit a jejichž výsledky jsou horší a tito pacienti jsou potenciálními kandidáty aToTx v rámci konsolidační léčby [93,94]. U nemocných s AML a průkazem NPM1 nebo CEBP α mutací, tedy s

mutacemi prognosticky příznivými, svědčí publikované výsledky též o uspokojivé účinnosti vysokých dávek cytosin arabinosidu v rámci konsolidační léčby a tito nemocní neprofitují ze zařazení aloTx do konsolidační strategie [180]. U pacientů s AML a intermediárním cytogenetickým rizikem je obecně též užíváno výše uvedené konsolidační schéma 3-4 cyklů vysokých dávek cytosin arabinosidu, nicméně publikované výsledky v posledních letech stále více dokládají lepší léčebné výsledky při provedení aloTx v rámci konsolidační léčby u této skupiny pacientů [53,54,181]. Zlepšení léčebných výsledků konsolidační léčby se zařazením aloTx u pacientů s intermediární cytogenetikou pak bude především lepší u pacientů, kde je prokazován nepříznivý molekulární marker např. FLT3/ITD a současně u pacientů, kteří mají nízká rizika transplantační mortality (dobrý celkový stav, nepřítomnost komorbidit atd.). U pacientů s AML a nepříznivou cytogenetikou jsou výsledky stávající konvenční konsolidační léčby vysoce neuspokojivé s 3 letým celkovým přežitím asi 10% [53,54]. Ještě horší léčebné výsledky jsou pak reportovány u AML s monozomálním karyotypem, kdy je 3 leté celkové přežití nižší než 10% [52]. U této skupiny pacientů je provedení aloTx v rámci konsolidační léčby považováno za standardní postup, což podporují jednoznačně publikované výsledky dokladující zlepšení nepříznivé prognózy těchto pacientů v případě provedení aloTx (viz.tabulka 35) [49,53,54,182].

Tabulka 35 - Srovnání léčebných výsledků transplantace a chemoterapie u AML s nepříznivou cytogenetikou [182]

	chemoterapie	alogenní transplantace	P
TRM	5%	15%	0.49
Relaps	77%	39%	0.0005
2 letý OS	24%	52%	0.005

Kromě pacientů s de novo AML a nepříznivým cytogenetickým nálezem mají též pacienti se sekundární AML (tzn. na podkladě předchozího hematologického onemocnění nebo pacienti léčení chemoterapií či radioterapií pro jinou malignitu před diagnostikou AML) neuspokojivé léčebné výsledky s konvenční cytostatickou léčbou. Sekundární AML představuje asi 20% AML a v současné době se stává významným medicínským problémem, protože její incidence a to především ve vyšších věkových kategoriích z důvodu prodloužení života a účinnější léčby nádorových onemocnění narůstá. Sekundární AML má neuspokojivé léčebné výsledky s nízkou šancí na dosažení KR AML a celkového přežití [43]. Příčinou nepříznivé prognózy u sekundární AML je zřejmě vyšší zastoupení nepříznivých cytogenetických aberací ve srovnání s nově diagnostikovanou AML [44,45]. Další faktory, které mohou vysvětlovat neuspokojivé léčebné výsledky u sekundární AML, souvisí se samotným předchozím onemocněním a jeho léčbou (dysfunkce orgánů, poškození normální hemopoézy, chronická imunoprese, rizika infekcí atd.)(32]. Samotné výsledky léčby sekundární AML jsou tedy nepříznivé. Například u sekundární AML vzniklé na podkladě MDS bylo intenzivní léčbou dosaženo KR u 41% pacientů a 3 leté přežití bylo 8%, což jsou statisticky významně horší výsledky ve srovnání s nově diagnostikovanou AML, u které bylo dosaženo KR u 71% nemocných a 3 letého přežití bylo dosaženo u 36% pacientů [46]. Podobně nepříznivé léčebné výsledky díky vyššímu zastoupení nepříznivých

cytogenetických nálezů byly reportovány u nemocných s AML na podkladě předchozí cytostatické léčby (viz. tabulka 36).

Tabulka 36 - Srovnání výsledků dle cytogenetických nálezů u pacientů s chemo/radioterapií spojené AML a nově diagnostikované AML [47]

Karyotyp	t-AML (n=121)	nově dg. AML (n=1511)	medián přežití (měsíce) t-AML	medián přežití (měsíce) nově dg. AML
Příznivý	24%	20%	27	Nedosažen
Intermediární	28%	60%	12	16
Nepříznivý	48%	20%	6	7

Těž u sekundární AML se zdá z publikovaných dat, že nejlepších léčebných výsledků bylo dosaženo u pacientů, kteří podstoupili aloTx. Publikované práce dokladují asi 20% až 30% dlouhodobé celkové přežití [183,184]. V případě uvedených AML s nepříznivými prognostickými faktory lze v případě nepřítomnosti vhodného HLA dárce vzhledem k neuspokojivým výsledkům konvenční léčby u vhodných pacientů zvažovat provedení alogenní transplantace z alternativních zdrojů, kam můžeme zařadit využití rodinného haploidentického dárce či provedení transplantace s využitím pupečnickové krve. Pacienti, kteří nemohou podstoupit aloTx jsou pak vhodnými adepty klinických studií s nově testovanými protileukemickými léky a pokud je to možné měla by tato možnost být pacientům navržena.

V rámci výše uvedené léčby akutní leukémie je v závislosti na rizikových faktorech přítomna skupina pacientů, kteří přes podanou intenzivní indukční léčbu a případně další intenzivní záchrannou terapii nedosáhnou KR AML. Hovoříme pak o rezistentní AML. Tito nemocní mají opět vysoce nepříznivou prognózu, kterou může částečně zlepšit provedení aloTx s reportovaným dosažením dlouhodobého přežití u 20% až 30% pacientů [185,186]. Zajímavý přístup k léčbě rezistentní AML byl publikován v rámci multicentrické studie využívající u pacientů s rezistentní AML podání vysokých dávek chemoterapie následované po několika dnech redukováným přípravným cytostatickým předtransplantačním režimem a aloTx s profylaktickou aplikací dárcovských lymfocytů v potransplantačním období, kdy bylo dosaženo celkového přežití ve 2 letech 42% [187].

U části pacientů s AML a v případě nepříznivých prognostických skupin u většiny z nich po předchozím dosažení KR dochází k relapsu AML. Specifickou skupinou relabujících pacientů jsou nemocní po aloTx, kterým bude vyhrazena část kapitoly o samotné aloTx. V případě relapsu AML u pacientů po konvenční intenzivní chemoterapii, ke kterému obvykle dochází v prvních 2 až 3 letech po dosažení KR AML, je jejich prognóza obecně nepříznivá a léčebné ovlivnění a vyléčení velice problematické [188,189,190]. Vzhledem k obecně špatné prognóze pacientů s relapsem AML je velmi důležité před zvažováním další intenzivní léčby zhodnocení šance na její úspěch. Účinnost léčby pacienta s relapsem AML závisí na několika faktorech, mezi které především patří doba od dosažení remise do relapsu, cytogenetické nálezy, věk a stav pacienta. Ke zhodnocení potenciální účinnosti léčby zrelabované AML lze u mladších pacientů využít publikovaný prognostický model (viz. tabulka 37) [189]. Prognostické skóre výsledku léčby zrelabované AML se týká pacientů mladších 60 let. Hodnoceny jsou doba od relapsu (>18 měsíců/0 bodů, 7-18 měsíců/3 body, ≤ 6

měsíců/5bodů), cytogenetický nálezn v době diagnózy (inv(16) nebo t(16;16)/0 bodů, t(8;21)/3body, ostatní/5 bodů), provedení alogenní transplantace (ne/0 bodů, ano/2body) a věk pacienta v době relapsu (≤ 35 let/0 bodů, 36-45 let/1 bod, >45 let/2 body).

Tabulka 37 - Prognostické skóre pro mladší pacientu s AML v relapsu [189]

Rizikové skóre	Počet rizikových bodů	Pravděpodobnost přežití v 1 roce	Pravděpodobnost přežití v 5 letech
Příznivé	0-6	70%	46%
Intermediární	7-9	49%	18%
Nepříznivé	10-14	16%	4%

Principem léčby pacientů s relapsem AML je navození další KR AML a obvykle snaha o konsolidaci provedením aloTx, protože konsolidační léčba samotnou chemoterapií je spojena s vysokým rizikem dalšího relapsu AML. V současné době není definován ideální cytostatický protokol k znovunavolení remise AML po jejím relapsu. Obvykle jsou využívány léčebné protokoly se středními nebo vysokými dávkami cytosin arabinosidu někdy v kombinaci s dalšími cytostatiky. Pokud není u nemocného po dosažení další KR AML dostupný příbuzný či nepříbuzný HLA vhodný dárce lze zvažovat využití alternativních zdrojů krvetvorných buněk ať už provedením haploidentické transplantace nebo využitím pupečnickové krve. Vyšší rizika vyplývající z provedení této transplantace jsou kompenzována vysokými riziky dalšího relapsu AML v případě neprovedení aloTx [189]. Pacienti, kteří dosáhli další KR AML a nemohou podstoupit aloTx mohou potenciálně profitovat z provedení autologní transplantace, kdy bylo v různých publikacích reportováno 20% až 50% dlouhodobé přežití [191,192].

2. Kurativní léčba u nemocných starších 60 let

Starší pacienti s AML mají často další závažná onemocnění a ve vyšším procentu jsou v době diagnózy AML ve špatném celkovém stavu, což vede k horší toleranci intenzivní chemoterapie a následně i vyšší léčebné mortalitě [34,35]. U starších pacientů též častěji diagnostikujeme sekundární AML na podkladě předchozího hematologického onemocnění či AML související s předchozí cytostatickou léčbou, které mají vysoce nepříznivou prognózu a nedostatečně odpovídají na cytostatickou léčbu případně časně relabují [36]. Nicméně samotný věk je nezávislý prognostický faktor a s narůstajícím věkem i při zohlednění dalších prognostických faktorů (celkového stavu, cytogenetiky, typu AML atd.) se zhoršují výsledky léčby AML [34,35]. Ve vyšším věku též pacienti častěji odmítají navrženou možnost podání intenzivní cytostatické léčby. Z určitého praktického hlediska lze starší pacienty rozdělit na věkovou skupinu 60 až 74 letých a 75 letých a starší.

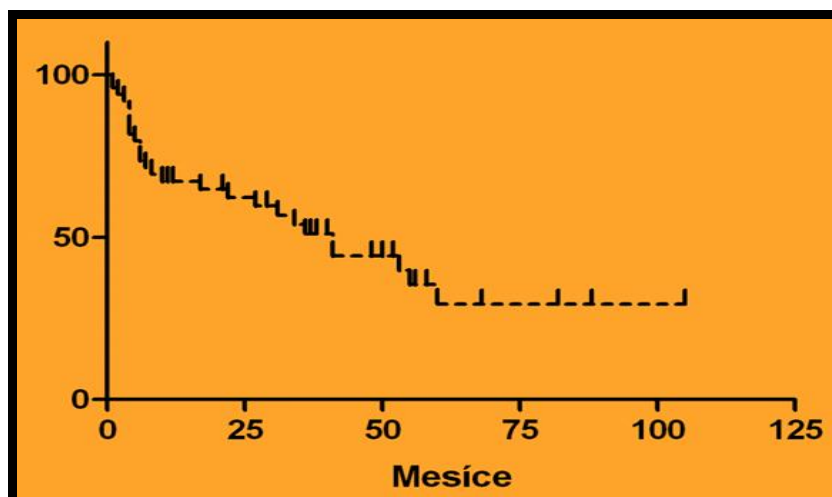
V případě léčby AML u skupiny starších nemocných ve věku 60 až 74 let lze s určitými specifiky či limitacemi postupovat podobně jako u nemocných mladších. Pro pacienty v dobrém celkovém stavu a bez závažných komorbidit, tzn. pro pacienty s nižšími riziky mortality spojené s intenzivní chemoterapií, lze podat indukční léčbu podobně jako u mladších nemocných tvořenou kombinací 3 denní aplikace antracyklinu (daunorubicin 45-60 mg/m²/den) a 7 denní infúze cytosin arabinosidu (100-200mg/m²/den). Díky

zlepšení podpůrné léčby byly v posledních letech publikovány výsledky, které dokladují možnost zvýšení dávky daunorubicinu na 90 mg/den s větší šancí na dosažení KR AML a s dobrou tolerancí u starších pacientů [193]. U starších pacientů podobně jako u mladších pacientů rozhoduje o dosažení KR AML dominantně cytogenetický nálezn. Šance na dosažení KR AML je u starších nemocných asi o 25% nižší než u mladších pacientů, což znamená, že v případě intermediárního cytogenetického rizika je KR AML u starších pacientů dosažena cca u 50% z nich a v případě nepříznivého cytogenetického rizika pak asi u 30% z nich. Navíc vzhledem k neuspokojivé konvenční konsolidační léčbě je dlouhodobé přežití u starších pacientů, kteří dosáhli KR AML, jenž měla prokazovány nepříznivé cytogenetické nálezy maximálně 5% [35, 194, 195]. Jinými slovy standardní cytostatická léčba u starších nemocných s AML a nepříznivou cytogenetikou má velmi špatné výsledky a je otázkou, zda výše uvedenou léčbu u těchto pacientů vůbec zahajovat. V době diagnostiky AML není samozřejmě výsledek cytogenetického vyšetření k dispozici, ale publikovaná data u starších pacientů s AML ukazují, že odložení zahájení intenzivní léčby neovlivňuje negativně výsledek léčby [196]. Proto pokud to klinický stav umožní lze u starších pacientů s diagnostikovanou AML vyčkat do výsledku cytogenetického vyšetření a v případě nepříznivého nálezu je zahájení standardní indukční léčby vzhledem k nepříznivým léčebným výsledkům diskutabilní a u těchto pacientů by bylo lepší jejich zařazení do klinických studií a chybou není ani podání pouze cytoredukční paliativní nízké dávkované chemoterapie. Výjimku v této skupině pacientů, kteří by mohli z intenzivní léčby profitovat, jsou pacienti, kteří mohou být kandidáty aloTx po redukované přípravě v rámci konsolidační léčby.

Narozdíl od indukční léčby, jenž je u starších pacientů podobná jako u mladších nemocných, tak v otázce konsolidační léčby u starších nemocných zůstává řada otazníků. Randomizované studie, které zkoumaly konsolidační léčbu u starších nemocných s AML jsou zatíženy vysokou selektivitou hodnoceného souboru, protože plánovanou léčbu podstoupila jen menší část ze vstupního souboru pacientů a jednalo se většinou o pacienty s příznivou nebo intermediární cytogenetikou, v dobrém celkovém stavu a bez dalších onemocnění [32]. U starších pacientů bylo provedeno několik randomizovaných studií týkajících se konsolidační léčby AML, jejichž výsledky i se zohledněním výše uvedených limitací studované populace nepřinášejí jednoznačná doporučení [197,198,199,200,201]. Výsledky uvedených studií ukazují, že v případě starších pacientů tito z důvodu vysoké toxicity neprofitují z vysokých dávek cytosin arabinosidu v rámci konsolidační léčby narozdíl od mladších pacientů [199]. Ačkoliv není jednoznačně definována konsolidační léčba AML pro starší nemocné obecně se doporučuje podání 2-3 cyklů chemoterapie s intermediárními dávkami cytosin arabinosidu [32,33]. Nicméně výsledky konsolidační léčby starších pacientů s AML jsou s výjimkou menšiny z nich s příznivým genetickým nálezem neuspokojivé. 3 leté celkové přežití starších pacientů s AML v případě intermediární genetické prognózy je asi 10% až 20% a v případě nepříznivého cytogenetického nálezu méně než 5%. [35, 194, 198]. Určité zlepšení dlouhodobé prognózy u části starších pacientů s AML by mohlo v rámci konsolidační léčby přinést provedení aloTx po redukované přípravě. Publikované výsledky samozřejmě do určité míry selektované skupiny starších pacientů s AML, kteří podstoupili aloTx po redukované přípravě jsou velice povzbudivé a to včetně využití nepřibuzného dárce s reportovaným celkovým přežitím 30 % až 60% [202,203,204,205]. Limitací uvedeného transplantačního postupu je, že transplantace je využitelná jen pro menší část starších pacientů s AML. Často citovaná

prospektivní práce z amerického Seattlu uvádí, že transplantaci podstoupilo jen 5% ze vstupního souboru starších pacientů s nově diagnostikovanou AML [203]. Nicméně naše zkušenosti ukazují, že v poslední dekádě ze 176 pacientů s nově diagnostikovanou AML na našem pracovišti 51 (29%) z nich podstoupilo alogenní transplantaci po redukované přípravě a 3 leté celkové přežití transplantovaných pacientů bylo 51% (viz. obrázek 5).

Obrázek 5 - Celkové přežití pacientů s AML po alogenní transplantaci krvetvorných buněk po redukované přípravě na Hematoonkologickém oddělení FN Plzeň v období 2003-2013.



V případě léčby AML u skupiny nemocných ve věku 75 let a starších je situace ještě horší. V případě intenzivní chemoterapie je obecně dosahováno KR AML maximálně u 25% nemocných a navíc vzhledem k obvykle horšímu celkovému stavu pacienta a častějším komorbiditám dosahuje léčebná mortalita do dne +56 od zahájení indukční intenzivní chemoterapie téměř 50% [35,194,195]. Nicméně malá část pacientů starších 75 let ve velmi dobrém klinickém stavu a s AML bez nepříznivých cytogenetických aberací může z intenzivních chemoterapií částečně profitovat [35,206]. Data velkých populačních registrů však jasně ukazují, že většina starších pacientů 75 let není léčena intenzivní chemoterapií. Publikovaná data z amerického registru SEER ukazují, že ve věku 75 až 84 let bylo léčeno intenzivně jen 24% pacientů s AML a data švedského registru akutních leukémií z novější doby ukazují, ale na populaci s obecně delší životní expektancí, že ve věku 75 až 84 let bylo léčeno intenzivně 45% pacientů s AML (viz. tabulka 38) [35,206].

Tabulka 38 - Procento pacientů s AML léčených intenzivní chemoterapií v závislosti na věku [35]

Věk	Počet intenzivně léčených pacientů s AML
60 - 64 let	92%
65 - 69 let	80%
70 - 74 let	67%
75 - 79 let	45%

K rozhodnutí o léčbě u starších pacientů s AML lze využít i některá prognostická skóre. Asi nejkomplexnější prognostické skóre hodnotí bodově několik prognostických faktorů: věk pacienta (60-64 let = 1, 65-69 let = 2, 70-74 let = 3, >75 let = 4 body), celkový stav dle WHO (0,1,2,3 a 4 body), cytogenetiku (příznivá/intermediární = 1, neznámá = 2 a nepříznivá = 5 bodů), počet leukocytů ($<10 \times 10^9/l$ = 1, $10-49 \times 10^9/l$ = 2, $50-99 \times 10^9/l$ = 3, $>100 \times 10^9/l$ = 4 body), a typ AML (primární = 1, sekundární = 3) (viz tabulka 39) [207].

Tabulka 39 - Prognostické skóre intenzivní léčby u starších pacientů s AML [207]

Prognostické skóre	Celkové přežití 1 rok	Celkové přežití 3 roky
Dobré (4-6 bodů)	53%	27%
Střední (7-8 bodů)	43%	13%
Špatné (9 a více bodů)	16%	7%

2.7.3 Paliativní léčba AML

Z výše uvedeného vyplývá, že značná část pacientů starších 60 let neprofituje z intenzivní léčby AML. Tito nemocní jsou pak obvykle léčeni symptomatickou léčbou obvykle doplněnou o nízké dávky cytostatik, což může u těchto pacientů vést k prodloužení života v řádu měsíců za tolerovatelných vedlejších projevů podávaných cytostatik. Nejčastěji používanými léky jsou hydroxyurea nebo nízké dávky cytosin arabinosidu. V rámci výsledků randomizované studie srovnávající uvedená dvě cytostatika a také pouhou podpurnou léčbu svědčily publikované výsledky pro vyšší účinnost nízkých dávek cytosin arabinosidu ve srovnání s hydroxyureou. Pacienti léčení cytosin arabinosidem dosáhli v 18% KR AML, nicméně medián přežití byl pouhé 3 měsíce a v případě AML s nepříznivou cytogenetikou byly nízké dávky cytosin arabinosidu neúčinné [207]. Vzhledem k vysoce nepříznivé prognóze pacientů, kteří nejsou kandidáty intenzivní chemoterapie je vhodné u těchto nemocných zvažovat léčbu novými testovanými antileukemickými léky v rámci klinických studií v případě jejich dostupnosti.

2.7.4 Transplantace krvetvorných buněk

1. Autologní transplantace

Autologní transplantace krvetvorných buněk je součástí standardní léčby u řady hematologických i nehematologických malignit, kdy zlepšuje přežití těchto pacientů. V případě autologní transplantace se nejedná o transplantaci v pravém slova smyslu. Jedná se o podání vysokých dávek cytostatik, které však kromě účinnějšího ovlivnění maligního onemocnění přináší i vysokou hematologickou toxicitu, jenž by vedla k protražovanému útlumu krvetvorby a tím by byl pozitivní léčebný efekt převážen závažnými komplikacemi vyplývajícími z protražované pancytopenie. Převod autologního štěpu krvetvorných buněk po podání vysokých dávek cytostatik pomáhá urychlit reparaci hodnot krevního obrazu a tím snížit rizika komplikací. Převod autologního štěpu krvetvorných buněk tedy umožňuje podání vysokých dávek cytostatik za minimalizace vedlejších projevů jejich aplikace. V rámci jednotlivých

onemocnění jsou využívány různé přípravné cytostatické režimy. Jako štěp autologních krvetvorných buněk byla v minulosti využívána především odebraná pacientova kostní dřeň, ale v posledních dvou desetiletích jednoznačně převládají štěpy stimulovaných cirkulujících krvetvorných buněk získané na separátorech krevních elementů. Vzhledem k tomu, že k odběru autologního štěpu dochází s delším časovým předstihem před podáním vysokodávkované chemoterapie, jsou odebrané štěpy uchovávané po předchozí řízené kryokonzervaci za nízkých teplot v parách tekutého dusíku. Specifická je též péče o pacienta v peritransplantačním období. Samotná indikace k autologní transplantaci, volba způsobu cytostatické přípravy, její administrace, způsob stimulace, odběr a kryokonzervace krvetvorných buněk a péče o transplantované pacienty je vysoce specializovaným oborem medicíny a tato léčba je soustředěna do specializovaných transplantačních center.

Na rozdíl od řady jiných onemocnění je význam provedení autologní transplantace u pacientů s AML nejednoznačný. Vzhledem k výsledkům provedených randomizovaných studií v minulosti nemá podání vysoce dávkované chemoterapie s podporou autologní transplantací krvetvorných buněk jednoznačná indikační doporučení. Výsledky těchto randomizovaných studií neprokázaly statisticky významné zlepšení přežití bez nemoci nebo celkové přežití v případě provedení autologní transplantace u nemocných s AML ve srovnání s jinými léčebnými modalitami [175,209,210,211,212]. Bohužel výsledky těchto studií jsou pro současnost limitovány několika faktory, mezi které patří nižší procento provedení autologní transplantace u randomizovaných pacientů k autologní transplantaci, relativně vysoká transplantační mortalita ve srovnání s aktuální situací a jako zdroj krvetvorných buněk byla využívána dominantně kostní dřeň [213]. Nicméně ani publikované výsledky studií v dalších letech neprokázaly zlepšení léčebných výsledků u pacientů s AML, kteří podstoupili autologní transplantaci ve srovnání s intenzivní konsolidační chemoterapií nebo aloTx [214,215,216,217]. Uvedené výsledky tedy nepodpořily logický předpoklad, že podání vysoké dávky cytostatik umožněné následným podáním autologního štěpu krvetvorných buněk sníží riziko relapsu AML za současně nízké léčebné mortality a tím dojde ke zlepšení celkového přežití pacientů. Obecně lze říci, že autologní transplantace je u pacientů s AML ve srovnání s aloTx zatížena vyšším rizikem relapsu a to především u nemocných s prognosticky nepříznivou AML. Tento fakt je kompenzován nižší transplantační mortalitou u autologní transplantace, což v minulosti publikovaných pracích vedlo ke srovnatelnému celkovému přežití u pacientů s AML po alogenní nebo autologní transplantaci a to především v případě AML s intermediárním rizikem [213]. V posledních letech díky zlepšení podpůrné léčby vedoucí ke snížení komplikací a mortality u aloTx však publikované výsledky i u pacientů s AML v 1.KR a intermediárním rizikem vyznívají ve prospěch alogenní transplantace při srovnání s autologní transplantací a to včetně využití nepříbuzného dárce krvetvorných buněk (viz. tabulka 40) [53,218].

Tabulka 40 - Srovnání výsledků alogenní a autologní transplantace u pacientů s AML v 1.KR a intermediárním rizikem [218]

	Příbuzenská alogenní transplantace	Nepříbuzenská alogenní transplantace	Autologní transplantace
Kumulativní incidence relapsů v 6 letech	23,7%	19,0%	48,4% (p= 0.0001)
6 leté přežití bez nemoci	61,6%	65,8%	43,8% (p=0,013)
6 leté celkové přežití	62,7%	67,2%	46,3% (p=0,022)

V případě srovnání výsledků konsolidační léčby AML v 1.KR autologní transplantací nebo intenzivní chemoterapií nejsou ani recentně publikovaná data zcela jednoznačná. U pacientů s AML a příznivou cytogenetickou prognózou nepřináší provedení autologní transplantace stejně jako aloTx zlepšení celkového přežití [41,177,178,179,219]. V případě AML s intermediární a nepříznivou cytogenetikou v případě nemožnosti provedení aloTx, a to v případě nepříznivé cytogenetiky včetně alternativních zdrojů krvetvorných buněk, některé z publikovaných prací dokladují zlepšení prognózy těch pacientů, kteří podstoupili autologní transplantaci krvetvorných buněk v rámci konsolidační léčby ve srovnání s pacienty léčenými pouhou chemoterapií [219,220]. Nicméně další práce zlepšení celkového přežití ve prospěch autologní transplantace nepotvrzují [214,215,221]. K obecnému zhodnocení využití autologní transplantace ve srovnání s intenzivní konsolidační chemoterapií asi nejlépe poslouží výsledky studie holandských a švýcarských autorů, které sice dokládají nižší riziko relapsu (58% vs. 70%) a lepší 5 leté přežití bez nemoci (38% vs. 29%) v případě provedení autologní transplantace, ale celkové přežití je srovnatelné (44% vs. 41%). Příčinou je mírně vyšší léčebná mortalita (4% vs. 1%) a horší přežití po relapsu (7% vs. 15%) u pacientů léčených autologní transplantací [221]. Špatné léčebné výsledky v případě relapsu po autologní transplantaci dokladují i publikovaná data mezinárodního registru transplantací IBMTR, kdy provedení aloTx v rámci léčby relapsu AML po autologní transplantaci dosahuje 5 letého celkového přežití jen 22%, což je dáno jednak trvajícím vysokým rizikem relapsu (33%) a především vysokou léčebnou mortalitou (44%), která pravděpodobně souvisí s předchozí expozicí vysokým dávkám cytostatik před autologní transplantací [222]. I přes srovnatelné výsledky však autologní transplantace může přinášet některá pozitiva, mezi která např. patří zkrácení doby konsolidační léčby AML při srovnatelných léčebných výsledcích ve srovnání s intenzivní chemoterapií [213,223]. Potenciální role autologní transplantace tedy nadále zůstává plně nezodpovězena a nelze vyloučit i její eventuální přínos v případě některých molekulárně definovaných AML v rámci intermediární cytogenetické prognostické skupiny. Nicméně k bližšímu zhodnocení role autologní transplantace jsou nezbytné další randomizované studie, které by tento předpoklad mohly ověřit [213,223]. Podobně je zvažován potenciální význam autologní transplantace v rámci konsolidační léčby u starších pacientů s AML. Starší nemocní s AML, jak již bylo výše uvedeno, dosahují nižšího efektu indukční léčby s dosažením kompletní remise v průměru asi u 40-60% pacientů a zásadním problémem zůstává vysoké riziko relapsu v

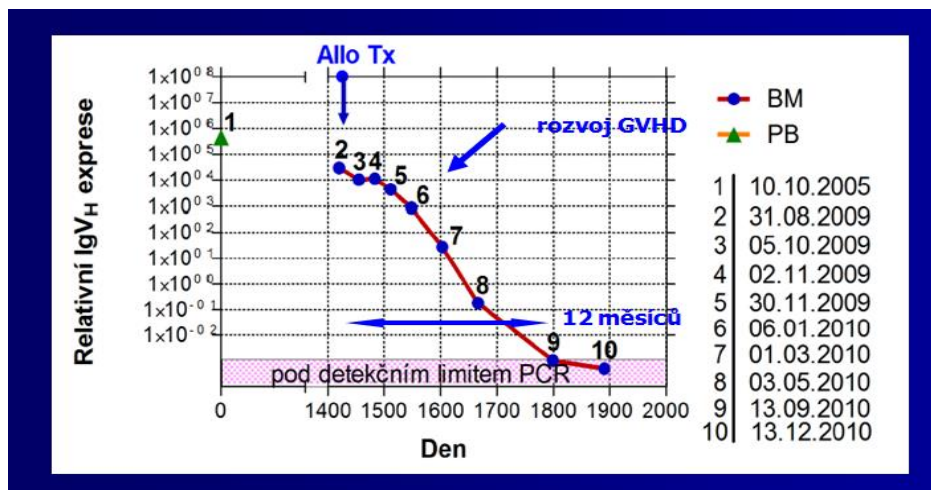
případě konsolidační léčby samotnou chemoterapií, což vede k dlouhodobému přežití u cca 10-20% pacientů. Provedení autologní transplantace by mohlo tedy ovlivnit vysoké riziko relapsu a zlepšit prognózu starších nemocných s AML. Bohužel nejsou k dispozici žádné randomizované studie u starších pacientů srovnávající autologní transplantaci s jinými léčebnými postupy. Nicméně některé publikované práce dokládají celkové přežití lepší než v případě samotné chemoterapie, které se pohybuje ve 3 letech mezi 30-40%. Bohužel podobně jako u aloTx a možná ještě více jsou tyto výsledky omezeny a potenciálně zkresleny vysokou selekcí pacientů, kteří nakonec autologní transplantaci podstoupili z původně léčeného souboru starších pacientů s AML [223, 224,225].

2. Alogenní transplantace

Provedení aloTx je v současné době nejúčinnější léčebnou modalitou u AML, což dokládají již výše uvedené informace o léčbě AML. AML patří k nejčastějším indikacím k provedení aloTx a např. v USA v roce 2010 bylo provedeno 9000 aloTx u pacientů s AML dle údajů CIBMTR [226]. Historicky byl efekt alogenní transplantace limitován vyššími riziky léčebné mortality. Nicméně v posledních letech díky hlubší znalosti imunologických dějů spojených s transplantací, zlepšením HLA typizace, využitím nových imunosupresivních léků, začleněním redukovaných přípravných režimů, zlepšením podpurné péče včetně zavedení nových léků a léčebných přístupů, kdy se jedná především o začlenění účinných antimykotik apod., došlo k významnému poklesu transplantační mortality a rozšíření spektra pacientů, kterým může být aloTx provedena např. i pacientům starším 60 let, což bylo ještě před 10-15 lety v podstatě raritní [227].

Příčinou efektivity alogenní transplantace v léčbě hematologických malignit včetně AML je imunologický efekt, jenž vede ke kontrole a zničení původních maligních buněk imunitními buňkami transplantovaného štěpu. Tento imunologický efekt se nazývá reakcí štěpu proti nádoru. Původně v počátcích transplantací krvinek, v 50. letech minulého století, se předpokládalo, že základem efektu alogenní transplantace jsou vysoké dávky záření případně cytostatik, které vedou ke zničení nádorových buněk a samotný převod alogenního štěpu jen zajišťuje regeneraci původní krvetvorby zničené zářením či chemoterapií tzn. podobný efekt jako v případě autologní transplantace krvinek. Nicméně s dalším výzkumem aloTx na zvířatech a s rozvojem dalšího poznání včetně objevení HLA znaků a s dalšími výsledky transplantací u lidí bylo zřejmé, že alogenní krvetvorné buňky jsou schopné v závislosti na hloubce imunologické inkompatibility rozpoznávat antigenní rozdíly a vyvolat u příjemců alogenního štěpu krvinek imunitní reakci nazývanou reakcí štěpu proti hostiteli, která především v úvodních letech bez hlubších imunologických znalostí a nedostupnosti účinných imunosupresiv byla příčinou transplantační mortality. Současně však bylo pozorováno, že jedinci u kterých dochází k rozvoji této reakce štěpu proti hostiteli mají též signifikantně nižší riziko relapsu původní malignity ve srovnání s autologní transplantací krvinek nebo aloTx bez rozvoje známek reakce štěpu proti hostiteli [228,229,230]. Tento protinádorový efekt štěpu byl nazván reakcí štěpu proti nádoru a postupně byl doložen u většiny hematologických malignit i některých nehematologických nádorových onemocnění (viz.obrázek 6).

Obrázek 6 - Reakce štěpu proti nádoru – křivka monitorace reziduální nemoci dle RT-PCR kvantifikace klonální IgVH u relabující a následně již chemorezistentní CLL: pokles reziduální nemoci po alogenní transplantaci díky reakci štěpu proti nádoru následně potencionané při rozvoji reakce štěpu proti hostiteli



Uvedený imunologický protinádorový efekt staví provedení aloTx u řady diagnóz mezi dosud neúčinnější způsoby léčby. Nicméně léčebná účinnost aloTx je limitována léčebnými riziky výkonu, které však se zlepšováním medicínských znalostí v posledních letech významně klesají, ale nadále nejsou v závislosti na řadě faktorů zanedbatelné [227]. Další limitací účinnosti aloTx je recidiva či relaps malignity po transplantaci. Toto riziko je relativně malé, nicméně opět v závislosti na typu a stádiu základního onemocnění, jeho prognostických markerech a na základě řady dalších faktorů souvisejících s pacientem, základním onemocněním i způsobem transplantace u každého pacienta rozdílné a v některých případech relativně vysoké. K provedení aloTx musí pacient naplňovat indikační criteria, což jinými slovy znamená, že aloTx může při zohlednění rizik a stavu základního onemocnění ve srovnání s riziky samotného výkonu zlepšit prognózu pacienta ve srovnání se standardní léčbou. K samotnému provedení alogenní transplantace je nutné nalézt HLA vhodného dárce krvetvorných buněk, musí být naplánována příslušná předtransplantační cytostatická příprava vyplývající z typu a stavu základního onemocnění a ze stavu pacienta a jeho tolerance cytostatické popřípadě radiační zátěže a podobně musí být zvolena příslušná imunosupresivní a další podpůrná léčba. Z uvedeného vyplývá, že provedení samotné transplantace pak musí být prováděno erudovaným týmem odborníků různých lékařských oborů v prostorách s mikrobiální protekcí a zavedeným režimem chránícím pacienty především před riziky infekčních komplikací. Kromě potenciálních závažných, často atypických, infekčních komplikací může být potransplantační období spojené se závažnými imunologickými reakcemi mezi transplantovanou krvetvorbou a organismem příjemce a dalšími časnými a pozdními specifickými potransplantačními komplikacemi, které opět vyžadují péči zkušených odborníků z různých lékařských oborů. Z pochopitelných důvodů jsou tedy aloTx prováděny celosvětově na vysoce specializovaných hematologických transplantačních centrech. Samotný výsledek aloTx závisí na řadě faktorů, mezi které patří typ, rizikové markery a stav základního onemocnění, věk, celkový stav a komorbidita nemocného, zdroj krvetvorných buněk

(příbuzný, nepříbuzný dárce, pupečnicková krev, HLA shoda, kostní dřeň, stimulované periferní krvevorné buňky), typ a intenzita předtransplantační přípravy, typ a způsob administrace imunosupresivní léčby atd.

V případě samotné AML patří v současné době, jak již bylo výše uvedeno, aloTx k nejúčinnějším léčebným přístupům, nicméně na základě výše uvedených faktorů, které ovlivňují výsledek transplantace, z aloTx profitují jen někteří nemocní s AML. Aktuální obecná doporučení týkající se významu a způsobu provedení aloTx u nemocných s AML lze shrnout zhruba do následujících bodů:

a) AML v 1.KR

Prospektivní studie v 80. a počátku 90 let minulého století dokládaly nižší riziko relapsu a lepší přežití bez nemoci u pacientů s AML v 1.KR, kteří podstoupili aloTx, ale z důvodu vyšší léčebné mortality bylo celkové přežití srovnatelné s jinými léčebnými modalitami [212,231]. Následně 6 pracovních skupin v rámci svých studií srovnávalo výsledky aloTx u pacientů s AML v 1.KR s chemoterapií případně autologní transplantací. Výsledky těchto studií však opět neprokazovaly zlepšení celkového přežití ve prospěch aloTx (viz.tabulka 41) [53, 209,210,212,216,233].

Tabulka 41 - Výsledky alogenní transplantace krvevorných buněk u pacientů s AML v 1.KR s chemoterapií či autologní transplantací [53,209,210,212,216,232]

Pracovní skupina	Frekvence relapsu			Přežití bez relapsu (4r)			Celkové přežití (4r)		
	Alo	Auto	CHT	Alo	Auto	CHT	Alo	Auto	CHT
EORTC/GINEMA AML8	24%	41%	57%	55%	48%	30%	59%	56%	46%
GOELAM	37%	45%	55%	49%	48%	43%	55%	52%	58%
ECOG/CALBG/SWOG	29%	48%	61%	43%	34%	34%	46%	43%	52%
EORTC/GINEMA AML10	30%	52%		52%	42%		58%	50%	
UK MRC AML10	36%	52%		50%	42%		55%	42%	
HOVON-SAKK	32%	59%		48%	37%		54%	46%	

Pokud však byla v rámci výsledků aloTx zohledněna vstupní prognostická cytogenetická rizika AML, pak opakovaná analýza pracovní skupiny EORTC/GINEMA u studie AML-10 ukázala, že v případě nepříznivé cytogenetické prognózy došlo u pacientů, kteří podstoupili aloTx s příbuzným dárce v 1.KR AML ke statisticky významnému zlepšení přežití bez relapsu (43% vs.18%) a především pak celkového přežití (50% vs 29%) [216]. Pracovní skupina HOVON-SAKK, pak doložila zlepšení celkového přežití v případě provedení aloTx nejen pro pacienty s nepříznivou cytogenetikou, ale i pro pacienty s intermediárním cytogenetickým rizikem [53]. Následně pak byla publikována velká metaanalýza klinických studií hodnotících význam aloTx v 1.KR AML u více než 3500 pacientů, která potvrdila statisticky významné zlepšení celkového přežití v případě provedení aloTx od příbuzného dárce u AML s intermediárním nebo nepříznivým cytogenetickým rizikem v 1.KR, nikoliv však u nemocných s AML v 1.KR a příznivou cytogenetikou [54]. Aktuálně lze tedy obecně uzavírat, že v případě dostupného HLA vhodného dárce u pacienta v uspokojivém klinickém stavu bez závažných komorbidit s AML v 1.KR s intermediární či nepříznivou cytogenetikou je provedení aloTx standardním léčebným postupem s největší, a to především v případě nepříznivé cytogenetiky, šancí na vyléčení leukémie. K uvedeným základním faktům lze na základě recentních publikací přidat některá upřesnění. V

rámci AML s příznivou cytogenetikou, tzn. s AML s t(8;21) nebo s inv(16) či t(16;16) tzn. fúzními geny RUNX1-RUNX1T1 resp. CBF β -MYH11, lze očekávat při léčbě samotnou chemoterapií asi 60-70% pravděpodobnost dlouhodobé kontroly AML. Publikovaná data doložila, že pacienti s AML a t(8;21) nebo inv(16)/t(16;16) profitují z podání 2 a více konsolidačních cyklů vysocedávkovaného cytosin arabinosidu a že u uvedených typů AML případné provedení aloTx v rámci konsolidační léčby nezlepšuje léčebné výsledky [41,177,178,179]. Nicméně část pacientů přes příznivou prognózu této skupiny AML relabuje. Mezi tyto pacienty patří nemocní, u nichž je prokazována mutace c-kit a jejichž léčebné výsledky standardní intenzivní chemoterapií jsou horší a tyto pacienti jsou tedy potenciálními kandidáty aloTx v rámci konsolidační léčby [93,94]. Podobně může potenciálně rizikové pacienty u této skupiny AML pomoci definovat stanovení a monitorace MRN, což dosud publikovaná data podporují [139,140]. Pacienti s AML a intermediárním cytogenetickým rizikem, jenž představují asi 50-60% ze všech, by měli na základě výše uvedených publikovaných dat profitovat z provedení aloTx v rámci konsolidační léčby v 1.KR AML. Tato skupina AML je však poměrně heterogenní a v poslední dekádě byla pospána řada mutací na molekulární úrovni, které blíže upřesňují prognózu pacientů s AML a intermediárním rizikem. Příznivým prognostickým molekulárně genetickým markerem je průkaz NPM1 mutace či průkaz mutace CEBP α bez současného průkazu mutace FLT3/ITD. Publikované léčebné výsledky této skupiny AML svědčí pro uspokojivou účinnost vysokých dávek cytosin arabinosidu v rámci konsolidační léčby a tyto nemocní neprofitují ze zařazení aloTx do konsolidační strategie [180]. Nicméně i v této skupině nemocných s intermediárním cytogenetickým rizikem a příznivými molekulárně genetickými markery část pacientů relabuje. Pokud by se podařilo identifikovat v rámci této skupiny pacientů ony rizikové, byli by to také vhodné kandidáty aloTx. K možnosti identifikovat tyto rizikové pacienty může přispět určení dalších genových mutací, které mohou zhoršovat nebo zlepšovat prognózu AML NPM1+/FLT3/ITD-, což potvrzují některá publikovaná data a může se jednat např. o průkaz mutace genů IDH1 a IDH2 [64]. Podobně může sloužit k identifikaci rizikových nemocných stanovení exprese mutovaného NPM1 genu v rámci monitorace MRN, což bylo též opakovaně doloženo [144,145,146,147]. Kromě příznivých molekulárních nálezů u AML s intermediárním cytogenetickým rizikem byly identifikovány genové mutace, které ukazují na nepříznivou prognózu této skupiny AML v případě konsolidační léčby samotnou chemoterapií. Zásadní u této skupiny AML je průkaz FLT3/ITD positivity. Klinický význam průkazu FLT3/ITD je nepříznivý. Pacienti s AML a mutací FLT3/ITD léčení samotnou chemoterapií mají signifikantně vyšší riziko relapsu a horší celkové přežití než pacienti s AML bez přítomnosti mutace FLT3/ITD [61, 62, 63, 64, 65, 180]. Provedení alogenní transplantace v rámci konsolidační léčby u AML s průkazem FLT3/ITD snižuje riziko relapsu a zlepšuje celkové přežití ve srovnání s konsolidační léčbou samotnou chemoterapií [180]. V současnosti byla identifikována řada dalších molekulárních markerů, které zhoršují nebo mohou zhoršovat prognózu AML s intermediárním cytogenetickým rizikem a u kterých provedení aloTx může vést ke zlepšení léčebných výsledků. Mezi tyto molekulární markery lze zařadit např. průkaz mutace genů DNMT3A, TET2, ASXL1 či MLL/PTD a dalších [64]. U pacientů s AML a nepříznivou cytogenetikou jsou výsledky stávající konvenční konsolidační léčby vysoce neuspokojivé s 3 letým celkovým přežitím asi 10%

[53,54]. U této skupiny pacientů je provedení aloTx v rámci konsolidační léčby považováno za standardní postup, což podporují jednoznačně publikované výsledky dokladující zlepšení nepříznivé prognózy těchto pacientů a to i přes vyšší riziko relapsu po transplantaci ve srovnání např. s AML s intermediárním rizikem. AloTx u této skupiny AML zlepšuje celkové přežití ve srovnání s chemoterapií více než dvojnásobně [49,53,54,182]. V rámci této skupiny můžeme definovat vysoce rizikovou skupinu AML s monozomálním karyotypem či změnami krátkého raménka chromozomu 17 nebo delecí či monosomií chromozomu 5, jejichž dlouhodobé přežití při léčbě samotnou chemoterapií je < 5% a provedení aloTx dosahuje díky přetrvávajícímu vysokému riziku relapsu dlouhodobého přežití jen u asi 20-30% nemocných (viz.tabulka 42)[52,233,234,235].

Tabulka 42. Výsledky alogenní transplantace krvetvorných buněk u pacientů s AML v 1.KR s chemoterapií či autologní transplantací [235]

Charakteristika AML	Kumulativní incidence relapse	2 leté přežití bez nemoci	2 leté celkové přežití
Monozomální karyotyp	55%	24%	30%
Monozomi 5, delece 5q	51%	29%	30%
Abnormality 17p	53%	11%	25%
Bez -5/del5 a změn 17p	31%	49%	53%

b) AML mimo 1.KR

Část pacientů s AML nedosáhne přes intenzivní indukční a následně záchranou chemoterapii KR AML. Tito nemocní mají opět vysoce nepříznivou prognózu, kterou může částečně zlepšit provedení aloTx s reportovaným dosažením dlouhodobého přežití u 20% až 30% pacientů [185,186]. Zajímavý přístup k léčbě refrakterní AML byl publikován v rámci multicentrické studie využívající u pacientů s refraktorní AML podání vysokých dávek chemoterapie následované po několika dnech redukováným přípravným cytostatickým předtransplantačním režimem a alogenní transplantací krvetvorných buněk s profylaktickou aplikací dárcovských lymfocytů v potransplantačním období, kdy bylo dosaženo celkového přežití ve 2 letech 42%. Uvedený přístup navíc umožňuje provést aloTx i u starších pacientů nebo pacientů s dalšími komorbiditami [187]. CIBMTR registr publikoval výsledky aloTx u 1673 pacientů s refraktorní nebo aktivní AML v době transplantace. Analýza těchto výsledků umožnila identifikovat 5 rizikových faktorů, které ovlivňují výsledek aloTx. Mezi tyto faktory patří: trvání remise < 6 měsíců, cirkulující blasty v periferní krvi, nepříznivá cytogenetika a Karnofsky stav < 90%. Pacienti, kteří neměli žádný z těchto rizikových faktorů měli 3 leté celkové přežití po aloTx 42%. Naopak pacienti s 3 a více rizikovými faktory měli celkové přežití ve 3 letech pouze 6% [236]. U relabující AML léčené pouze chemoterapií dochází i přes dosažení 2.KR AML ve většině případů k dalšímu relapsu AML. Provedení aloTx u pacientů s relabující AML po dosažení 2.KR zlepšuje prognózu těchto pacientů ve srovnání s léčbou pouhou chemoterapií. Například zhodnocení 1271 pacientů léčených v rámci studií MRC AML10, AML12 a AML15, kteří nebyli po dosažení KR AML alogenně transplantováni a následně zrelabovali, ukazuje že v

případě provedení aloTx v 2.KR AML bylo dosaženo celkového přežití 42% ve srovnání s 16% v případě léčby samotnou chemoterapií [237]. Určitým dilematem je fakt, zda v případě relapsu AML není lepší provést aloTx přímo v době relapsu (ideálně incipientního s infiltrací kostní dřeně blasty <30%) s šancí na dlouhodobé vyléčení u cca 30%-40% pacientů [187,236,238, 239]. Tento postup může totiž dosahovat lepších výsledků než léčba relapsu AML chemoterapií s cílem dosažení 2.KR AML, protože jen asi 30-60% pacientů dosáhne 2.KR a pokud pak podstoupí aloTx, tak zhruba 40-50% dosáhne trvalého vyléčení, což znamená, že vyléčení dosáhne jen 15-30% ze všech relabujících nemocných, a to je méně než v případě provedení aloTx v době relapsu bez reindukční chemoterapie [237,240]. Bohužel limitací této strategie je skutečnost, že v době relapsu není obvykle nalezen HLA vhodný dárce, což obvykle znemožní provedení časně aloTx. Určitou možností zvyšující šanci na využití této léčebné strategie by byla snaha a časně (po stanovení diagnózy) vytipování vhodného alogenního dárce krvetvorných buněk pro všechny pacienty. Tedy i ty pacienty, kteří nebudou indikováni po dosažení 1.KR AML k aloTx. Velmi špatnou prognózu i přes případné provedení aloTx mají pacienti s relapsem AML, kteří po reindukční léčbě nedosáhnou 2.KR AML [189]. Samostatnou skupinou je AML relabující po aloTx. Léčba relapsu AML po alogenní transplantaci má neuspokojivé výsledky s reportovaným asi 15% celkovým přežitím ve 2 letech po relapsu [241]. Obecně lze říci, že lepší prognózu mají pacienti s pozdním relapsem AML po aloTx (12 měsíců) a k léčbě se využívá podání infuze dárcovských lymfocytů častěji v kombinaci s předchozí chemoterapií. U některých pacientů lze zvažovat retransplantaci případně využití některý z nově zkoušených léků (hypometylační látky, inhibitory tyrozin kináz apod.).

c) Zdroj krvetvorných buněk

Dárcovské krvetvorné buňky byly historicky získávány odběrem kostní dřeně. Díky zjištění, že zárodečné krvetvorné buňky se uvolňují z kostní dřeně do periferní krve, kdy jejich množství lze významně zvýšit předchozí stimulací (v případě alogenních dárců) podáním růstových faktorů granulopoezy a díky zvládnutí jejich odběru pomocí separátoru krevních elementů a při standardizovaném měření získaného množství CD34+ krvetvorných buněk se tzv. “periferní krvetvorné buňky” staly v průběhu 90.let minulého století alternativním zdrojem štěpu u aloTx. Díky relativní snadnosti odběru, vyššímu počtu CD34+pozitivních buněk a rychlejšímu přihojení štěpu se periferní krvetvorné buňky staly preferovaným zdrojem krvetvorných buněk a v současné době je asi dvě třetiny transplantací provedeno jejich pomocí [242,243]. Pro úplnost je třeba uvést, že dalším potenciálním zdrojem krvetvorných buněk je pupečnicková krev. Ta však v současnosti u dospělých pacientů patří k alternativním zdrojům štěpu a bude podrobněji zmíněna v další části textu. Jednotlivé zdroje krvetvorných buněk se liší řadou vlastností, které mohou finálně ovlivňovat výsledek aloTx a které mohou a hrají roli v preferenci transplantačního centra pro volbu zdroje krvetvorných buněk u konkrétní transplantace. Rozdíly mezi jednotlivými štěpy jsou v rychlosti jejich získání, potenciálních komplikacích pro dárce a množství jednotlivých buněčných elementů, kdy například množství erytrocytů a plasmy je u periferních krvetvorných buněk nižší než u kostní dřeně, což může hrát roli v případě neshody krevní skupiny mezi dárce a příjemcem. Naopak počet CD34+krvetvorných buněk, ale i zralých T-lymfocytů je vyšší ve štěpu periferních krvetvorných buněk, což snižuje rizika rejekce štěpu a ovlivňuje

rychlost obnovy krvetvorby ve prospěch periferních krvetvorných buněk. Na druhou stranu riziko rozvoje akutní a především pak chronické nemoci z reakce štěpu proti hostiteli je nižší u pacientů transplantovaných kostní dření, což však u této skupiny může především u rizikovějších onemocnění zvyšovat incidence relapsů (viz. tabulka 43) [244]. Důležitým a často rozhodujícím faktorem ovlivňujícím volbu typu štěpu jsou však faktory na straně samotného dárce. Například u příbuzného dárce mohou být zdravotní důvody, které neumožní nebo zvyšují rizika celkové anestézie a nemůže být tedy proveden odběr kostní dřeně. No a zcela rozhodující je pak samotné rozhodnutí dárce, který má právo se na základě detailních informací o jednotlivých způsobech darování rozhodnout jakým způsobem bude darovat.

Tabulka 43 - Srovnání jednotlivých typů štěpu pro alogenní transplantaci krvetvorných buněk [244]

	Kostní dřeň	Periferní krev	Pupečníková krev
Doba do transplantace od zahájení vyhledávání u nepříbuzného dárce	3-6 měsíců	3-6 měsíců	2-4 týdny
Obvyklý objem	500-2000 ml	50-300 ml	25-150 ml
Potenciální komplikace pro dárce	riziko infekce z místa odběru, krvácení, rizika celkové anestézie atd.	bolesti při aplikaci růstových faktorů, krvácení, infekce, trombóza, hypotenze, elektrolyt. dysbalance	Žádné
Minimální množství buněk pro transplantaci	2x10 ⁸ /kg nukleárních buněk	2x10 ⁶ /kg CD34+ bb.	2,5x10 ⁷ /kg nukleárních buněk
Množství erytrocytů	Vysoké	nízké	Nízké
Možnost následného darování	Ano	ano	ne
Expozice DMSO (kryokonzervant)	Ne	ne	ano
Vhodná HLA shoda dárce a příjemce	těsná shoda (9-10/10)	těsná shoda (9-10/10)	nižší shoda (4-6/6)
Přihojení neutrofilů	3 týdny	2 týdny	4 týdny
Imunitní rekonstituce	Rychlá	rychlá	pomalá
Riziko nemoci z reakce štěpu proti hostiteli	Střední	vyšší	nízké
Riziko potransplantačních infekcí	Nižší	nižší	Vyšší
Přenos latentních virových infekcí	Vyšší	vyšší	Nižší
CMV pozitivita dárce a riziko přenosu CMV	Vyšší	vyšší	Nižší
Riziko relapsu	Vyšší	nižší	Vyšší

V případě příbuzného HLA kompatibilního dárce existuje řada randomizovaných studií srovnávajících výsledky aLoTx při použití krvetvorných buněk získaných z kostní dřeně nebo periferní krve. Výsledky jednotlivých studií se obvykle shodují v rychlejším přihojení štěpu v případě použití periferních krvetvorných buněk, nicméně v riziku rozvoje nemoci z reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), riziku relapsu, transplantační mortalitě a celkovém přežití se liší [244]. Podobně je tomu u publikovaných dat meta-analýz randomizovaných studií. Např. při hodnocení 1111 pacientů z 9 metanalýz svědčí publikované výsledky o srovnatelném celkovém

přežití při použití periferních krvetvorných buněk nebo kostní dřeni, ale přežití bez nemoci je statisticky významně lepší v případě použití periferních krvetvorných buněk. Současně provedená subanalýza skupiny pacientům s pokročilým základním onemocněním prokazovala v případě použití periferních krvetvorných buněk nejen statisticky významné zlepšení přežití bez nemoci, ale i zlepšení celkového přežití u této skupiny pacientů s rizikovou malignitou. Použití periferních krvetvorných buněk bylo též spojeno s vyšším rizikem rozvoje akutní i chronické GVHD, nižším rizikem relapsu a srovnatelnou transplantační mortalitou [245]. Recentně publikovaná meta-analýza 11 randomizovaných studií však dokladovala srovnatelné celkové přežití, přežití bez nemoci a transplantační mortalitu při srovnání periferních krvetvorných buněk a kostní dřeni. V případě použití periferních krvetvorných buněk došlo k statisticky významně rychlejšímu přihojení neutrofilů a vyšší incidence akutní i chronické GVHD [246]. V případě nepříbuzenské alogTx byly publikovány výsledky randomizované studie u 551 pacientů po myeloablativní přípravě srovnávající kostní dřev a periferní krev, kdy měly obě skupiny transplantovaných pacientů srovnatelnou incidence akutní GVHD, 2 leté přežití bez nemoci, 2 leté celkové přežití (PBSC 51% vs BM 46%). Naopak využití periferní krve jako zdroje krvetvorných buněk bylo spojeno s nižším rizikem selhání štěpu (3% vs 9%) a vyššímu riziku rozvoje chronické GVHD (48% vs 32%) [247].

d) **Nepříbuzný dárce krvetvorných buněk**

Alogenní transplantace krvetvorných buněk zlepšuje v 1.KR, jak bylo výše uvedeno, u AML s intermediárním a vysokým cytogenetickým rizikem léčebné výsledky. Ovšem fakta podporující toto doporučení vycházejí z výsledků transplantací od příbuzného dárce. Nicméně pouze asi 25-30% pacientů s AML v 1.KR indikovaných k alogenní transplantaci nalezneme HLA shodného příbuzného dárce [248]. V úvahu tedy připadá využití nepříbuzného HLA shodného dárce. Historicky výsledky nepříbuzenských transplantací byly horší než v případě příbuzných dárců, ale především díky zlepšení typizace transplantačních tedy HLA znaků pomocí molekulárně genetických metod svědčí publikovaná data z novější doby v případě AML o srovnatelných výsledcích při využití příbuzného či nepříbuzného dárce. V případě pacientů s cytogeneticky nepříznivou AML transplantovaných již v letech 1996-2005 byly doloženy na základě analýzy dat CIBMTR databáze srovnatelné léčebné výsledky u nepříbuzenských transplantací ve srovnání s transplantacemi příbuzenskými [249]. Poslední publikované retrospektivní analýzy dokládají srovnatelné výsledky příbuzenských a nepříbuzenských transplantací též u AML s intermediárním cytogenetickým rizikem. Navíc poslední velká analýza dat CIBMTR databáze hodnotící výsledky více než 2000 transplantací doložila, že 3 leté přežití po alogenní transplantaci od příbuzného, nepříbuzného, ale i nepříbuzného dárce s 1 HLA neshodou je srovnatelné (viz. tabulka 44) [250,251].

Tabulka 44 - Pravděpodobnost přežití u pacientů s AML na základě typu dárce v 2 a 3 letech po transplantaci [251]

	Příbuzný dárce	Shodný nepřibuzný dárce	Nepříbuzný dárce s 1 HLA neshodou	P
2 letý OS	42%	42%	40%	NS
3 letý OS	37%	37%	36%	NS

e) Alternativní dárce

Část pacientů s AML indikovaných k aloTx nemá HLA vhodného příbuzného nebo nepřibuzného dárce. U těchto pacientů a především pak u těch, jejichž prognóza je v případě neprovedení alogenní transplantace špatná, lze využít tzv. alternativního dárce krvetvorných buněk. V úvahu tedy připadá již výše zmiňované využití pupečnickové krve. Potenciální výhodou pupečnickové krve je její rychlá dostupnost, potřeba menší HLA shody a nižší rizika rozvoje GVHD. Naopak limitací využití pupečnickové krve je pomalejší přihojení štěpu a rekonstituce imunity spojené s vyššími riziky transplantační mortality. U dospělých pak je její využití limitováno především menším počtem buněk obsažených v pupečnickové krvi, což by mohlo ohrozit přihojení štěpu. Další nevýhodou pupečnickové krve je nemožnost využití opakovaného darování např. při potřebě aplikace infúze dárcovských lymfocytů a v neposlední řadě je využití pupečnickové krve spojeno s vyšší cenou samotné transplantace [244]. Výsledky srovnávající výsledky alogenní transplantace při využití pupečnickové krve ve srovnání s HLA vhodným nepřibuzným dárce jsou ve svých závěrech poněkud kontroverzní. Využití pupečnickové krve je obvykle spojeno s nižším rizikem rozvoje GVHD, srovnatelným rizikem relapsu a vyšším rizikem transplantační mortality. Část publikací pak dokladuje horší celkové přežití v případě využití pupečnickové krve [252,253,254]. Naopak část publikovaných dat dokládá srovnatelné výsledky alogenní transplantace v případě AML při srovnání pupečnickové krve a nepřibuzného dárce [255,256]. Nízký počet krvetvorných buněk, který obsahuje jeden štěp pupečnickové krve, může být překonán použitím dvou štěpů pupečnickové krve od rozdílných dárců při zachování HLA shody 4-6/6 [257]. Několik publikací pak dokládá srovnatelné celkové přežití při použití dvou štěpů pupečnickové krve ve srovnání s výsledky transplantace krvetvorných buněk od příbuzného nebo nepřibuzného dárce (viz. tabulka 45) [258,259,260].

Tabulka 45 - Transplantační výsledky při použití dvou štěpů pupečnickové krve a srovnání s výsledky za využití příbuzného a nepřibuzného dárce [258]

	"double" pupečnicková krev	příbuzný dárce	nepříbuzný HLA shodný dárce	nepříbuzný dárce s HLA neshodou
Neutrofilů > 0,5x10 ⁹ /l	26 dní	16 dní	19 dní	18 dní
Trombocyty > 20x10 ⁹ /l	53 dní	20 dní	21 dní	21 dní
5 leté přežití bez leukémie	51%	33%	48%	38%
Kumulativní incidence relapsu v 5 letech	15%	43%	37%	35%
Transplantační mortalita v 5 letech	34%	24%	14%	27%
Akutní GVHD II-IV stupně	60%	65%	80%	85%

Akutní GVHD III-IV stupně	22%	13%	14%	37%
Chronická GVHD	26%	47%	43%	48%

Dalším alternativním zdrojem resp. dárcem může být haploidentický příbuzný dárc (rodič, sourozenec, dítě). Historicky vysoké riziko nemoci z reakce štěpu proti hostiteli, vysoké riziko potransplantačních infekčních komplikací, rejekce štěpu, transplantační mortality a vyšší riziko relapsu byly v posledních letech významně zlepšeny novými transplantačními postupy při využití haploidentického dárce. Jednou z možností je pozitivní selekce CD34 pozitivních buněk ze štěpu od haploidentického dárce s podáním jejich vysokého počtu příjemci. Uvedený přístup vedl k uspokojivému přihojení štěpu, nízké incidenci GVHD s reportovaným přežitím bez nemoci 35-40%. Nicméně díky pomalé imunorekonstrukci po transplantaci byl tento přístup zatížen vysokým rizikem infekčních komplikací [261,262]. Podobné transplantační výsledky byly dosaženy i využitím haploidentického štěpu s deplecí CD3 pozitivních lymfocytů a případně i CD19 pozitivních lymfocytů, kdy byla rekonstrukce imunity rychlejší a frekvence infekčních komplikací nižší [263, 264]. V poslední době však převládá v rámci haploidentických transplantací podání nemanipulovaného štěpu (tzn. bez deplece T lymfocytů) spojené s potransplantačním podáním cyklofosfamidu [265,266,267]. Publikované srovnání transplantačních výsledků při podání nemanipulovaného haploidentického štěpu s podáním haploidentického štěpu s deplecí T lymfocytů vyznělo ve prospěch nemanipulovaného haploidentického štěpu s lepším celkovým přežitím v 1 roce (64% vs 30%), nižší transplantační mortalitou (16% vs 42%) a nižší incidencí chronické GVHD (7% vs 18%). Současně docházelo k rychlejší imunorekonstrukci a nižší incidenci infekčních komplikací [268]. Publikovaná retrospektivní analýza pak dokladuje srovnatelné výsledky aloTx u hematologických malignit při použití příbuzného dárce, HLA shodného nepříbuzného dárce a haploidentického dárce (nemanipulovaný štěp, cyklofosfamid po transplantaci) [269]. Podobně byly publikovány výsledky multicentrické studie, které dokladovaly srovnatelné transplantační výsledky při použití nemanipulovaného haploidentického štěpu nebo dvou štěpů pupečnickové krve s celkovým přežitím v 1 roce 54% vs 62% [270]. Zajímavá data přináší publikace, kde pacienti s AML se středním nebo vysokým rizikem po dosažení 1.KR a bez HLA vhodného dárce měli možnost volby mezi pokračováním v chemoterapii nebo podstoupením alogenní haploidentické transplantace. Hodnocení obou léčebných strategií pak vyznělo statisticky signifikantně ve prospěch provedení haploidentické aloTx (viz. tabulka 46) [271].

Tabulka 46. Srovnání chemoterapie a haploidentické transplantace u AML v 1.KR a středním nebo vysokým rizikem [271]

	Chemoterapie (74)	Haploidentická Tx (58)	P
Incidence relapse	57%	12%	<0.0001
4 leté přežití bez nemoci	44,2%	73,1%	<0.0001
4 leté celkové přežití	54,7%	77,5%	0.001

I přes poměrně nadějně výsledky patří využití haploidentického dárce pro transplantaci krvetvorných buněk mezi postupy, které jsou alternativou využití klasického HLA shodného příbuzného či nepříbuzného dárce a další její možnosti jsou intenzivně zkoumány. K zkoumaným oblastem patří optimalizace přípravného předtransplantačního protokolu, profylaktické imunosupresivní léčby a především pak možnost využití buněčné terapie ať už selekcí různých subtypů T-lymfocytů s jejich odstraněním nebo naopak aplikací v rámci haploidentické transplantace a to samé se týká možnosti potenciálního využití aplikace mesenchymálních buněk či NK buněk atd. [244].

f) Přípravný předtransplantační protokol

Přípravný předtransplantační protokol je významnou součástí samotné aLoTx a jeho volba může významně ovlivnit transplantační výsledky. Přípravný předtransplantační protokol je tvořen kombinací cytostatik a v některých případech je jeho součástí též celotělové ozáření. Přípravný předtransplantační protokol má za úkol odstranit původní krvetvorbu včetně minimalizace případné maligní buněčné populace, navodit imunusupresi a tím umožnit přihojení transplantovaných krvetvorných buněk a minimalizovat riziko relapsu malignity ideálně za minimálních projevů samotné toxicity aplikovaných cytostatik či radioterapie. Historicky byly využívány myeloablativní přípravné režimy minimalizující riziko relapsu, nicméně byly zatížené vysokou toxicitou a omezenou možností provedení transplantace při jejich podání na skupinu mladších pacientů v dobrém klinickém stavu a bez závažných komorbidit. Poznání, že významnou ne-li rozhodující roli ve finálním ovlivnění malignity přináší imunologický efekt reakce štěpu proti nádoru spíše než intenzita přípravného předtransplantačního protokolu, došlo na přelomu tisíciletí k zavedení přípravných předtransplantačních protokolů se sníženými dávkami cytostatik nebo radioterapie. Tyto přípravné protokoly díky nižší toxicitě umožnily provedení aLoTx u vyššího počtu pacientů [272]. Aktuálně jsou přípravné protokoly na základě hloubky myeloablace a toxicity rozděleny na myeloablativní, redukované a nemyeloablativní [273]. V případě myeloablativních protokolů patří k nejvyužívanějším v rámci přípravy před aLoTx pro AML celotělové ozáření v kombinaci a cyklofosfamidem nebo protokol tvořený pouze cytostatiky, kdy radioterapii nahrazuje podání busulfanu. Historické práce dokladovaly lepší přežití bez nemoci a celkové přežití při využití myeloablativního protokolu využívajícího radioterapii [274,275]. V současné době po zavedení i.v. podávání busulfanu však poslední analýzy srovnávající myeloablativní přípravu u AML prokazují nižší transplantační mortalitu, lepší přežití bez nemoci a lepší celkové přežití v případě kombinace i.v. busulfanu s cyklofosfamidem [276,277]. V posledních letech v rámci snahy o další redukci toxicity myeloablativních přípravných režimů byly zkoušeny i další kombinace cytostatik. Například standární kombinace cyklofosfamidu s busulfanem byla nahrazena kombinací fludarabinu s busulfanem. Publikované výsledky svědčily pro nižší toxicitu nově zkoušené kombinace [278,279]. V případě AML však publikované výsledky ukazovaly nižší přežití bez relapsu a nižší celkové přežití u uvedené kombinace fludarabinu s busulfanem ve srovnání s kombinací cyklofosfamidu a busulfanu [280]. Kromě uvedené alternativy myeloablativního cytostatického protokolu jsou využívány i další cytostatika např. kombinace melfalanu s busulfanem či kombinace treosulfanu s fludarabinem atd. [281,282]. Jak již bylo výše uvedeno, tak použití

myeloablativních režimů je spojeno s vyšší toxicitou a provedení aloTx po myeloablativní přípravě u starších nemocných nebo u pacientů s dalšími komorbiditami je spojeno s vysokými riziky transplantační mortality. Zavedením redukovaných nebo nemyeloablativních režimů bylo dosaženo nižší toxicity podaného přípravného předtransplantačního protokolu, což umožnilo rozšířit provedení aloTx i na uvedené rizikové skupiny pacientů. Existuje řada redukovaných či nemyeloablativních přípravných režimů, které mají rozdílné složení a rozdílnou toxicitu (viz. tabulka 47). V současné době díky chybění randomizovaných studií neexistuje jednoznačné doporučení, který protokol je nejvýhodnější a konkrétní volba přípravného redukovaného či nemyeloablativního přípravného protokolu je ovlivněna především zkušenostmi jednotlivých transplantačních center s daným protokolem.

Tabulka 47 - Rozdělení redukovaných a nemyeloablativních přípravných režimů [272,273]

<i>Redukované režimy</i>	<i>Nemyeloablativní režimy</i>
TBI ≤ 500 cGy jednorázově nebo ≤ 800 cGy frakcionovaně	Fludarabin+cyklofosamid + ATG
Busulfan celkově ≤ 9 mg/kg	Fludarabin+ Ara-C + idarubicin
Melfalan celkově ≤ 140mg/m²	Kladribin + Ara-C
Thiotepa < 10 mg/kg	TBI ≤ 2Gy +/- purinový analog

Obvykle se tyto režimy skládají z fludarabinu případně kladribinu v kombinaci s dalšími cytostatiky či nižšími dávkami celotělového ozáření. K typickým kombinacím patří např. fludarabin a melfalan či busulfan s fludarabinem nebo kombinace treosulfanu s fludarabinem atd. [272]. V případě využití redukovaných nebo nemyeloablativních režimů před aloTx u AML publikovaná data dokládají, že intenzita přípravného předtransplantačního protokolu koreluje s incidencí relapsu AML po transplantaci [283,284]. V roce 2013 pak jedna z větších retrospektivních publikovaných analýz u 878 transplantovaných nemocných s AML nebo MDS dokladovala vyšší riziko relapsu v případě redukované přípravy ve srovnání s myeloablativní přípravou (39% vs. 23%) [285]. Nicméně výše uvedenými studiemi dokladované vyšší riziko relapsu AML v případě využití redukovaných přípravných režimů je současně spojeno s nižšími riziky transplantační mortality, kdy naopak myeloablativní přípravné režimy mají transplantační mortalitu vyšší a výsledné celkové přežití je nakonec u obou typů přípravy srovnatelné. Například analýza EBMT srovnávající 315 transplantovaných pacientů po redukované přípravě s 407 pacienty po myeloablativní přípravě s AML, kteří byli starší 50 let, dokladovala vyšší riziko relapsu v případě redukovaného přípravného režimu (41% vs. 24%) při nižší transplantační mortalitě (22 vs 31%) a výsledně za srovnatelného přežití bez nemoci a celkového přežití [286]. Na základě výše uvedených faktů a při chybění prospektivních randomizovaných studií jsou redukované nebo nemyeloablativní přípravné režimy u AML používány obvykle u pacientů starších 50-55 let, u nemocných v horším celkovém stavu či dalšími závažnějšími komorbiditami nebo u nemocných, kteří v rámci léčby již podstoupili autologní transplantaci [287,288].

g) Stav pacienta

AloTx je přes svou vysokou terapeutickou účinnost limitována kromě možnosti relapsu AML riziky vyplývajícími ze samotné transplantace. Komplikace samotné transplantační léčby zvyšují morbiditu a s ohledem na celkové přežití pak především mortalitu transplantovaných pacientů. Riziko transplantační mortality, které se v závislosti na řadě faktorů pohybuje zhruba mezi 10-50%, je zásadně ovlivněno faktory, které souvisí s věkem, celkovým stavem a přidruženými onemocněními pacienta, který transplantaci podstupuje. Samotný kalendářní věk pacienta nepochybně ovlivňuje výsledek aloTx a lze připustit, že s narůstajícím věkem vzrůstá riziko transplantační mortality. Tento fakt byl již výše dokladován vyšší transplantační mortalitou u starších nemocných, kteří podstoupili aloTx po myeloablativní přípravě. Samotný kalendářní věk je pak také součástí EBMT-risk skóre, které je všeobecně využíváno k odhadu celkového přežití po transplantaci a rizik transplantační mortality (viz. tabulka 48).

Tabulka 48 - EBMT-risk skóre [289,290]

Rizikový factor	Rizikové body
Věk	
< 20	0
20 – 40	1
>40	2
Stádium nemoci	
časné	0
střední	1
pozdní	2
Doba od dg. do transplantace, měsíce	
< 12	0
>12	1
Typ dárce	
příbuzný	0
nepříbuzný	1
Pohlaví příjemce a dárce	
všichni ostatní	0
Dárce žena , příjemce muž	1

Pacienti s EBMT-risk skóre (0 bodů) pak mají v 5 letech transplantační mortalitu 11% a celkové přežití 74%. Naopak pacienti s vysokým EBMT-risk skóre (6-7 bodů) mají v 5 letech transplantační mortalitu 45% a celkové přežití 25% [289,290]. Samotný kalendářní věk je tedy nepochybně významným faktorem, ale protože pacienti srovnatelného věku mohou být v jiném celkovém stavu, fyzické kondici a mohou mít různá přidružená onemocnění využívají se k posouzení transplantačních rizik spíše parametry hodnotící tyto faktory. Celkový stav pacienta se hodnotí dle různých rizikových skóre (Karnofsky, WHO) [291,292]. Obecně jsou obvykle hodnoceny schopnosti pacienta ve smyslu sebeobsluhy, jeho denní aktivita a projevy nemoci na celkový stav. Publikované výsledky pak dokládají, že celkový stav pacienta je nezávislým prognostickým faktorem ovlivňujícím transplantační mortalitu a celkové přežití po transplantaci (viz. tabulka 49) [293,294, 295].

Tabulka 49 - Karnofsky stav a vliv na transplantační mortalitu a přežití [295]

	transplant.mortalita 2 letech	celkové přežití ve 2 letech
Karnofsky \geq 90%	22%	57%
Karnofsky < 90%	39%	37%

K posouzení přidružených onemocnění se u transplantovaných pacientů široce využívá "Hematopoietic cell transplantation – specific comorbidity index (HCT-CI)" [37]. Skórovací systém hodnotí postižení jednotlivých orgánů a další parametry rizikovými body (viz. tabulka 50). Výsledný součet rizikových bodů pak určuje prognózu transplantovaného pacienta (viz. tabulka 51)

Tabulka 50 - HCT-CI definice [37]

Onemocnění	Definice	Skóre
Arytmie	fibrilace nebo flutter síní, „sick sinus“ syndrom, ventrikulární arytmie	1
Kardiální	závažná skleróza koronárních tepen, srdeční selhávání, infarkt myokardu, EF<50%	1
zánětlivé onemocnění GIT	Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida	1
cerebrovaskulární	TIA, ictus	1
psychiatrické	deprese, úzkost vyžadující psychiatrickou konzultaci či léčbu	1
jaterní (lehké)	hepatitida, zvýšený bilirubin do 1,5 násobku normy, AST/ALT zvýšené do 2,5 násobku normy	1
Obezita	BMI > 35 kg/m ²	1
Infekční	infekce vyžadující antimikrobiální léčbu	1
Revmatologické	SLE, RA, polymyozitida atd.	2
vředová choroba žaludku	vyžadující léčbu	2
renální (střední/těžké)	sérový kreatinin>176,8 umol/l, dialýza, předchozí transpl. Ledviny	2
plicní (střední)	DLCO a/nebo FEV1 66%-80%, dušnost při lehčí aktivitě	2
předchozí nádorové	léčeno kdykoliv v minulosti kromě karcinomu kůže	3
plicní (těžké)	DLCO a/nebo FEV1 <65%, klidová dušnost, potřeba oxygenoterapie	3
jaterní (těžké)	Jaterní cirhóza, zvýšený bilirubin nad 1,5 násobku normy, AST/ALT zvýšené nad 2,5 násobku normy	3
chlopenní vada	kromě prolapsu mitrální chlopně	3

Tabulka 51 - Vliv HCT-CI na časnou mortalitu a přežití u nemocných starších 60 let s AML po transplantaci [38].

HCT-CI	úmrtní do dne +28	medián přežití (týdny)
0	3 %	45
1-2	11%	31
3 a více	29%	19

Zajímavou stratifikaci přináší pak publikace hodnotící vliv celkového stavu pomocí Karnofsky skóre a HCT-CI na výsledek nemyeloablativní transplantace u starší pacientů, kde výsledná analýza stratifikuje 4 skupiny pacientů s rozdílnými transplantačními riziky (viz. tabulka 52) [293].

Tabulka 52 - Vliv kombinace HCT-CI a celkového stavu na přežití u nemocných starších 50 let s AML léčených aloTx [293].

Riziková skupina	HCT-CI	Karnofsky skóre	2 leté celkové přežití
I	0-2	>80%	68%
II	0-2	≤ 80%	58%
III	>3	>80%	41%
IV	>3	≤80%	32%

Přes široké využití HCT-CI a publikačně potvrzený jeho význam v rámci zhodnocení potransplantačních rizik některé práce jeho validitu nepotvrdily a případně stratifikaci dále upřesňovaly [295,296].

2.7.5 Nové léčebné postupy v léčbě AML

V posledních zhruba 15 letech došlo díky výzkumu molekulární podstaty nádorových onemocnění ke značnému rozšíření onkologické léčby a to především ve smyslu léčby “šité na míru” tzn. rozšíření o preparáty, které cíleně a v řadě případů selektivně ovlivňují nádorové buňky a zařazení těchto léků do léčby významně ovlivňuje její účinnost. V případě hematologických nádorových onemocnění zavedení nových léků zásadně ovlivnilo prognózu a způsob léčby řady hematologických malignit. Nejmarkatnějším příkladem může být chronická myeloidní leukémie, která do konce 90.let minulého století patřila s výjimkou provedení alogenní transplantace (v té době nejčastější indikace k aloTx) k nevléčitelným onemocněním s mediánem přežití 4-5 let. Po zavedení léčby pomocí inhibitorů tyrozin kináz (imatinib, nilotinib, dasatinib atd.) však došlo k zásadnímu ovlivnění léčebných výsledků s přežíváním cca 90% pacientů v 8 letech od diagnózy a s odsunutím dosud jediné kurativní léčby tzn. aloTx až do 2. či 3.linie léčby pro “raritní” případy selhání léčby inhibitory tyrozin kináz. K dalším skupinám léků, která zásadně ovlivnily léčbu hematologických malignit, patří v posledních letech imunoterapie protilátkami (rituximab, ofatumumab, alemtuzumab, brentuximab vedotin atd.) v případě lymfomů ale i akutní lymfoblastické leukémie, léčba imunomodulačními léky (thalidomid, lenalidomid, pomalidomid atd.) a inhibitory proteazomu (bortezomib, carfilzomib) v případě mnohočetného myelomu i dalších hematologických malignit, hypometylační léčba (azacytidin, decitabin) v případě myelodysplastického syndromu, inhibice BCR signální dráhy (idelalisib, ibrutinib) u nonhodgkinských lymfomů atd. Bohužel v případě AML v současné době přes intenzivní výzkum a provedení řady studií s hodnocením různých léků zůstává zatím standardní léčba AML v posledních desetiletích beze změn. V rámci výzkumů nových léků a léčebných přístupů u AML byly a jsou zkoumány nová cytostatika (clofarabin, elacytarabin, CPX-351, sapacitabine, bendamustin atd.), protilátky (gentuzumab ozogamycin), hypometylační látky (azacytidin, decitabin), inhibitory histon deacetylázy (vorinostat, entinostat, panobinostat atd.), inhibitory FLT3 signálu (sorafenib, midostaurin, lestaurtinib, AC220 atd.), inhibitory “polo-like” kinázy (volasertib), inhibitory mTOR (everolimus, temsirolimus), retinoidy (ATRA, bexaroten), imunomodulační léky (lenalidomid atd.), inhibitory proteozomu (bortezomib atd.), inhibitory farnesyl transferázy (tipifarnib), statiny (pravastatin, lovastatin), EGFR inhibitory (erlotinib), imunoterapie atd.

Tento intenzivní výzkum, což je patrné z výše uvedeného výčtu zkoumaných léků, zatím zásadně neovlivnil dosud používané standardní terapeutické postupy u AML. Nicméně probíhá řada klinických studií II a III. fáze, které mohou doložit některé nadějně již publikované výsledky. Z výše uvedených nových léků našly, alespoň v některých případech, své klinické využití pouze hypometylační látky a na základě výsledků posledních randomizovaných studií lze snad předpokládat potenciální inkorporaci gentuzumab ozogamycinu (anti-CD33 konjugovaná protilátka) do léčebných protokolů zřejmě však po provedení dalších klinických studií.

a) Hypometylační látky

DNA metylace zásadně ovlivňuje genovou expresi a společně s dalšími epigenetickými faktory (např. modifikací histonů) se podílí na kancerogeneze. V případě AML je pak aberantní DNA metylace frekventním nálezem a patří k faktorům, jenž se podílí na samotné leukemogenezi a tím se DNA metylace stává i potenciálním terapeutickým léčebným cílem [297]. V současné době jsou k dispozici dva hypometylační léky, které doložili svou účinnost v léčbě AML, a to především u starších pacientů, a které mají jako jediné z dosud zkoušených nových léků schválení k léčbě AML u starších nemocných. Prvním z těchto léků je decitabin (5-aza-2'-deoxycytidine). Tento lék byl zkoumaný již od 60 let minulého století zpočátku ve vysokých dávkách jako antimetabolit samotný nebo v kombinaci s antracykliny v léčbě AML. Až později v 80. letech pak bylo zjištěno v preklinických studiích, že v nízkých dávkách díky hypometylačním účinkům vede k obnovení genové exprese a diferenciaci leukemických blastů. Od roku 2004 pak proběhlo s nadějnými výsledky několik klinických studií fáze I a II s decitabinem u AML [298]. Na základě těchto studií pak byla provedena studie III. fáze "DACO-016 study" srovnávající skupinu pacientů léčených decitabinem se skupinou pacientů léčených léčbou volby nebo nízkými dávkami cytosin arabinosidu nebo pouze podprůnou léčbou [299]. Výsledky této studie byly, i vzhledem k designu této studie, poněkud kontroverzně přijímány, i když dokládaly s hraniční statistickou signifikancí zlepšení celkového přežití ve skupině pacientů léčených decitabinem (7,7 měsíce vs. 5 měsíců, $p = 0.037$). Současně provedená subanalýza nedoložila žádné zlepšení celkového přežití u pacientů s 20-30% infiltrací kostní dřeně. Výsledky této poněkud kontroverzní studie pak vedli ke schválení decitabinu do léčby pacientů starších 65 let s AML, kteří nemohou podstoupit intenzivní léčbu. Naopak v USA nebyl decitabin v léčbě AML u starších pacientů schválen [300]. Druhým hypometylačním lékem je azacytidin (5-azacytidine), který patří také mezi nukleosidové analogy a který podobně jako decitabin prokázal efektivitu v léčbě AML u starších pacientů v rámci klinických studií I a II. fáze. Randomizovaná studie III. fáze u starších pacientů s MDS a AML do 30% infiltrace kostní dřeně blasty srovnávající léčbu azacytidinem s jinými léčebnými přístupy "AZA-001 Study" prokázala zlepšení celkového přežití ve prospěch podávání azacytidinu (medián celkového přežití 19,1 měsíce vs. 13,1, $p=0,03$), což vedlo ke schválení užití azacytidinu v léčbě AML s 20-30% infiltrací kostní dřeně v případě neúnosnosti pacienta k intenzivní léčbě [301]. V současnosti též probíhá další randomizovaná studie III. fáze srovnávající léčbu azacytidinem s ostatními léčebnými přístupy přímo u AML. Využití hypometylačních látek je též zvažováno jako "most" k aloTx a také probíhají studie zkoumající využití hypometylačních látek v léčbě a dokonce profylaxi relapse AML po aloTx.

b) *Imunoterapie*

V rámci léčby AML probíhal a probíhá intenzivní výzkum možnosti léčby specifickými protilátkami proti antigenům exprimovaným na leukemických blastech. V rámci této skupiny protilátek je pak nejvíce publikovaných dat věnováno výsledkům léčby gentuzumab ozogamicinem. Gentuzumab ozogamicin je humanizovaná konjugovaná anti-CD33 (antigen v 85-90% exprimovaný na blastech AML) protilátka s DNA poškozujícím toxinem calicheamicinem, kdy po navázání protilátky na povrchový antigen dochází k její internalizaci do buňky, kde pak může toxin působit [302]. Bohužel výsledky publikovaných studií i jejich metaanalýzy jsou kontroverzní bez jednoznačného zlepšení celkového přežití a s potenciálně vyššími riziky léčebné mortality, což vedlo k neschválení gentuzumabu lékovými agenturami v USA i v Evropě pro léčbu AML [303,304,305,306,307,308,309]. Nicméně detailní metaanalýza uvedených studií dokladovala potenciální příznivý vliv na léčbu AML ve smyslu zlepšení celkové přežití při použití nižších dávek gentuzumab ozogamicinu v kombinaci s cytostatiky, především pak u pacientů s příznivou a intermediární cytogenetickou prognózou [309]. K ověření těchto výsledků však bude nutné provedení dalších klinických studií. V rámci imunoterapie, i když jak již bylo výše uvedeno zatím pouze v rámci prvotního zkoumání, je kromě využití protilátek namířených proti jiným potenciálním leukemickým antigenům (anti-CD123, anti-CD135) velice zajímavé potenciální využití stimulace T buněčné imunity v léčbě AML pomocí protilátek BiTE (bispecifické protilátky vázající kromě leukemického antigenu též T-lymfocyty) a adoptivní podání T-lymfocytů s CAR (chimerický antigenní receptor) [302,310, 311, 312].

3. Cíl dizertační práce

Stanovení exprese mutovaného NPM1 genu pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase jako markeru charakterujícím hladinu reziduální nemoci u pacientů s akutní myeloidní leukémií s normálním karyotypem a prokazovanou mutací NPM1 genu a zhodnocení významu přítomnosti minimální reziduální nemoci na výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk v kontextu dalších známých prognostických transplantačních faktorů.

3.1 Úvod

Akutní myeloidní leukémie (AML) je v současné době kurativně léčena intenzivní indukční léčbou, kterou lze obecně dosáhnout asi v 60-80% kompletní remise (KR) onemocnění. Nicméně bez další konsolidační léčby by docházelo u většiny pacientů k relapsu AML. Volba a intenzita konsolidační léčby, kterou v podstatě představuje další chemoterapie nebo alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloTx), pak vychází z řady prognostických faktorů. Mezi tyto faktory lze obecně zařadit faktory související se samotnou AML (cytogenetika, molekulárně genetické markery, léčebná odpověď atd.) a faktory, které souvisí se samotným pacientem (věk, celkový stav, komorbidita). Přestože se samotná strategie a složení kurativní léčby v posledních 20 letech v případě AML nezměnily, došlo v poslední dekádě ke zlepšení léčebných výsledků díky detailnějšímu poznání biologie AML a stejně tak díky zlepšení podpůrné léčby, která umožňuje zvládat dříve fatální komplikace intenzivní chemoterapie nebo aloTx, a u které pak především zlepšení HLA typizačních technik, rozšíření redukováných přípravných režimů, zlepšení diagnostiky a léčby virových resp. mykotických infekcí vedlo k výraznému poklesu transplantační mortality [248,313,314]. V rámci poznání samotné biologické podstaty AML se z klinického hlediska jeví jako nejdůležitější zhodnocení prognózy AML na základě cytogenetických změn v leukemických blastech a díky rozvoji molekulárně genetických diagnostických metod pak průkaz molekulárně genetických změn, z nichž u některých byl doložen jejich význam pro další stratifikaci prognózy AML [32,48,49,50,51,52]. Současně byl v rámci řady studií upřesňován význam aloTx v léčbě AML [53, 209,210,212,216,233]. V posledních letech pak je díky rozvoji diagnostických metod stále více využívána ke zhodnocení léčby AML detekce minimální reziduální nemoci (MRN). Současně se na základě publikovaných prací ukazuje, že dosažená hladina MRN prognosticky upřesňuje úspěšnost a efektivitu intenzivní cytostatické léčby u AML. Nicméně zatím s výjimkou akutní promyelocytární leukémie [137] nejsou výsledky detekce MRN součástí standardních léčebných doporučení, i když publikovaná data stále více podporují význam stanovení MRN u AML. K definitivnímu zařazení stanovení MRN do standardních léčebných schémat je nutné finálně definovat odpovědi na tyto otázky: co by mělo být monitorováno, jaká metodika by měla být použita, jaký materiál, zda je použitá metodika standardizována mezi laboratořemi, jak definovat prognostické hladiny, kdy má být MRN monitorována a jaké máme léčebné možnosti u pacientů s prokazovanou MRN [138]. K uvedeným otázkám prozatím chybí definitivní odpovědi, které by umožnily zařazení výsledků stanovení MRN do léčebných algoritmů u AML, ale dosud publikovaná data již alespoň částečně ukazují na zásadní význam monitorace léčebné odpovědi pomocí MRN v případě intenzivní léčby AML. K monitoraci MRN se v současné době využívají

nejčastěji dvě metody, mezi které patří kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) a multiparametrová průtoková cytometrie (MFCM). K molekulárním markerům AML, které umožňují monitoraci MRN s citlivostí $1:10^5-10^6$ pomocí RT-PCR patří fúzních geny (RUNX1-RUNX1T1, CBF β -MYH11 atd.). Právě v případě AML s příznivou prognózou (AML s t(8;21) nebo s inv(16) či t(16;16) resp. fúzními geny RUNX1-RUNX1T1, CBF β -MYH11) lze očekávat při léčbě samotnou chemoterapií asi 60-70% pravděpodobnost dlouhodobé kontroly AML. Nicméně část pacientů přes příznivou prognózu této skupiny AML relabuje a stanovení a monitorace MRN by mohla v tomto případě pomoci definovat část pacientů, u nichž standardní samotná chemoterapie bude spojena s vyššími riziky selhání léčby a tito pacienti by mohli být i přes obecně příznivou prognózu „své“ AML indikováni k aloTx, případně v rámci monitorace k časné léčebné intervenci. Dosud publikovaná data u tohoto typu leukémií uvedené předpoklady podporují [139,140]. Výsledky monitorace MRN pomocí RT-PCR u 278 pacientů s AML s t(8;21) nebo inv(16)/t(16;16) léčených v rámci studie MRC AML-15 ukázaly, že pokles MRN po indukční léčbě predikuje riziko relapsu AML (viz.tabulka 1 a 2), podobně jako pokles MRN po dalších cyklech chemoterapie. V rámci monitorace MRN po ukončení léčby AML byl doložen význam hladiny prokazované MRN na riziko relapsu i celkové přežití (viz.tabulka 3 a 4) [140].

Tabulka 1 - Kumulativní riziko relapsu u AML s t(8;21) dle poklesu hladiny MRN po indukčním cyklu léčby [140]

Pokles MRN vyšetřením z BM	Kumulativní incidence relapsu
< 1 log	100%
1-2 Log	42%
2-3 log	30%
>3 log	4%

Tabulka 2 - Kumulativní riziko relapsu u AML s inv(16)/t(16;16) dle poklesu hladiny MRN po indukčním cyklu léčby [140]

MRN vyšetřením z PB	Kumulativní incidence relapsu
> 500 kopií	100%
10-500 kopií	56%
< 10 kopií	21%

Tabulka 3 - Riziko relapsu a celkové přežití u AML s t(8;21) dle hladiny MRN po ukončení léčby a v průběhu další monitorace cyklu léčby [140]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu	Předpokládané přežití
> 500 kopií	100%	57%
< 500 kopií	7%	94%

Tabulka 4 - Riziko relapsu a celkové přežití u AML s inv(16)/t(16;16) dle hladiny MRN po ukončení léčby a v průběhu další monitorace cyklu léčby [140]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu	Předpokládané přežití
> 50 kopií	100%	25%
< 50 kopií	10%	100%

Pomocí fúzních genů lze monitorovat MRN u maximálně 25% AML. Využití monitorace MRN pomocí RT-PCR rozšiřuje možnost kvantifikace dalších molekulárních genových mutací prokazovaných u AML (FLT3/ITD, NPM1, MLL/PTD, DNMT3A atd.) s podobnou hloubkou citlivosti jako u fúzních genů. Nicméně zde hraje klíčovou roli stabilita dané mutace v průběhu onemocnění, kdy například v případě využití FLT3/ITD je uváděna velká nestabilita při srovnání výsledků z doby diagnózy AML a relapsu AML [141,142]. Podobně může být problematická monitorace MRN pomocí MLL/PTD, protože na nízkých hladinách je uvedená mutace prokazována u téměř většiny zdravých lidí [143]. Naopak monitorace frekventní (40-60% AML s normálním karyotypem) mutace NPM1 genu se jeví díky stabilitě mutace a vysoké expresi mutovaného NPM1 genu jako ideální marker pro monitoraci MRN pomocí RT-PCR u AML [144]. Řada publikovaných prací pak dokládala význam monitorace NPM1 mutace k upřesnění prognózy AML s mutací NPM1 genu [144,145,146,147]. Průkaz NPM1 mutace po skončení indukční fáze léčby, po skončení konsolidace a průkaz více než 2% NPM1/ABL v průběhu následné monitorace byl hodnocen jako nejsilnější nezávislý prognostický faktor pro riziko relapsu a celkové přežití u AML s NPM1 mutací (viz. tabulka 5,6,7) [146].

Tabulka 5 - Riziko relapsu a celkové přežití u AML s NPM1 mutací dle hladiny MRN po ukončení indukční léčby [146]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu	Předpokládané přežití
NPM1 negat.	6,4%	87%
NPM1 pozit.	53,0%	41%

Tabulka 6 - Riziko relapsu a celkové přežití u AML s NPM1 mutací dle hladiny MRN po ukončení konsolidační léčby [146]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu	Předpokládané přežití
NPM1 negat.	15,7%	80%
NPM1 pozit.	66,5%	44%

Tabulka 7 - Riziko relapsu u AML s NPM1 mutací dle hladiny MRN v průběhu monitorace po ukončení konsolidační léčby [146]

Hladina MRN (BM)	Riziko relapsu
< 200 kopií NPM1 /10000 kopií ABL	0%
> 200 kopií NPM1 /10000 kopií ABL	100%

Kromě využití kvantifikace fúzních genů či kvantifikace vybraných pro AML specifických genových mutací lze k monitoraci MRN pomocí RT-PCR u AML využít i genů, u kterých je v době diagnózy AML prokazována jejich zvýšená exprese (WT1, BAALC, atd.). Na rozdíl od výše uvedených možností je v případě sledování pouhé exprese genů stanovení MRN limitováno nižší senzitivitou, protože exprese uvedených genů je v malém množství prokazována i u zdravých jedinců. I přes tuto limitaci publikovaná data dokladují, že monitorace zvýšené exprese genů pomocí RT-PCR umožňuje predikovat riziko relapsu a dlouhodobé přežití u AML [109,148,149,150]. Nejvíce publikovaných prací je věnováno významu exprese WT1 v genu, který je navíc využitelný pro monitoraci MRN u více než 70% AML [151]. Využitím standardizované metodiky RT-PCR v rámci projektu evropské skupiny pro studium leukémií „European Leukemianet“ byl pokles exprese WT1 genu o 2 řády po indukční léčbě vyhodnocen jako nezávislý prognostický faktor pro riziko relapsu (viz tabulka 8). Podobně průkaz nad normu zvýšeného počtu kopií WT1 genu vyšetřením z kostní dřeně (>250 kopií WT1 genu/10000 kopií ABL genu) nebo periferní krve (>50 kopií WT1 genu/10000 kopií ABL genu) těsně po skončení konsolidační léčby nezávisle predikoval vyšší riziko následného relapsu (viz tabulka 9) [149].

Tabulka 8 - Kumulativní riziko relapsu u AML dle poklesu hladiny exprese WT1 genu po indukční léčbě [148]

Pokles MRN vyšetřením z PB či BM	Kumulativní incidence relapsu
> 2 log	40%
< 2 log	75%

Tabulka 9 - Kumulativní riziko relapsu u AML dle hladiny exprese WT1 genu těsně po skončení konsolidační léčby [148]

Pokles MRN vyšetřením z PB či BM	Kumulativní incidence relapsu
> 2 log	40%
< 2 log	75%

MFCM je další senzitivní vyšetřovací metodou, která může být a je využívána k detekci submikroskopické MRN u pacientů s AML. Výhodou MFCM oproti RT-PCR, která je nejsenzitivnějším způsobem detekce MRD limitovaným však využitelností jen u cca 50-60% AML, je možnost jejího využití u více než 80% nemocných s AML. K dalším výhodám MFCM patří možnost relativně rychlého provedení a získání příslušných výsledků, možnost rozlišení mrtvých a živých buněk a relativně uspokojivá senzitivita. Monitorace MRN pomocí MFCM využívá detekce patologické exprese povrchových antigenů na leukemických buňkách a jejich kombinací. Patologická kombinace znaků na leukemických buňkách se nazývá imunofenotypem asociovaným s leukémií. Právě využití současné detekce několika různých antigenů na jedné buňce díky MFCM umožňuje dosažení citlivosti metodiky 1:10000-100000 [138,152]. Určitou limitací MFCM je skutečnost, že v době diagnózy je v případě AML detekováno několik patologických s leukémií spojených imunofenotypů a že tedy v rámci monitorace MRN je nutné vyšetření

všech vstupních patologických klonů k minimalizaci nepřesných výsledků a to i vzhledem ke skutečnosti, že v případě relabující AML může dojít u části případů ke změně vstupního patologického imunofenotypu [153,154]. Podobně jako u monitorace MRN pomocí RT-PCR publikované práce dokládají prognostický význam stanovení MRN využitím MFCM ke zhodnocení rizika relapsu a šance na dlouhodobé přežití nemocných s AML [155,156,157]. Například práce hodnotící MRN u AML pomocí MFCM u 100 uniformně léčených pacientů doložila nezávislý statistický prognostický význam MRN v období po indukci a po konsolidaci ve smyslu predikce přežití bez relapsu a celkového přežití (viz.tabulka 10,11). Důležitým a zajímavým zjištěním této práce byl též fakt, že pacienti, kteří měli po indukci detekovanou MRN s následnou její negativitou po konsolidaci měli srovnatelné přežití bez relapsu a celkové přežití jako pacienti s negativní MRN již po indukční léčbě [157].

Tabulka 10 - 5 leté přežití bez relapsu a celkové přežití u AML dle positivity či negativity MRN (limit 0,035%) za využití její detekce pomocí MFCM po skončení indukční léčby [157]

Hladina MRN (BM)	Přežití bez relapsu	Celkové přežití
MRN negat.	51%	48%
MRN pozit.	22%	25%

Tabulka 11 - 5 leté přežití bez relapsu a celkové přežití u AML dle positivity či negativity MRN (limit 0,035%) za využití její detekce pomocí MFCM po skončení konsolidační léčby [157]

Hladina MRN (BM)	Přežití bez relapsu	Celkové přežití
MRN negat.	71%	64%
MRN pozit.	13%	16%

Mnohem méně je známo na rozdíl od standardní chemoterapie o významu MRN v případě léčby AML pomocí aloTx. Léčebný efekt aloTx závisí nejen na intenzitě předtransplantační cytostatické přípravy, ale především pak na potransplantačním imunologickém efektu imunokompetentních buněk štěpu, tzv. reakci štěpu proti leukémii, který zásadně ovlivňuje léčebný význam aloTx ve smyslu snížení rizika relapsu AML [228,229,230]. Tento imunitní efekt je natolik účinný, že aloTx doložila svou účinnost i v případě chemorezistentní AML, kdy bylo reportováno dosažení dlouhodobého přežití u 20% až 30% pacientů [185,186]. S ohledem na dokladovanou účinnost aloTx v léčbě AML zčásti efektivní i v případě selhání cytostatické léčby a rezistenci AML, pak pochopitelně vzniká otázka, zda celkem logický a publikačně opakovaně doložený fakt o prognostickém významu stanovení MRN v případě standardní cytostatické léčby AML, lze využít též v rámci aloTx jako další potenciální prognostický faktor upřesňující výsledek transplantace. Většina pacientů s AML podstupuje aloTx v kompletní remisi onemocnění tedy v době, kdy eventuální reziduální onemocnění je řádově nižší než u rezistentní AML a vzhledem k uváděné efektivitě reakce štěpu proti leukémii je tedy zásadní otázkou, zda stanovení MRN u AML v kompletní remisi před aloTx může podobně jako u intenzivní

chemoterapie přinést prognostickou informaci o výsledku transplantační léčby. Dosud publikované práce obvykle využívající k detekci MRN MFCM ukazují, že stanovení hladiny MRN před aloTx může mít prognostický význam pro výsledek transplantace. Limitací těchto publikací je však obvykle menší velikost souboru pacientů, zastoupení různých typů AML, různá diagnostická metodika stanovení MRN a také fakt, že ne všechny práce prognostický význam MRN dokládají [315,316,317,318,319,320,321]. S cílem ověřit a zhodnotit potenciální prognostický význam stanovení hladiny MRN před aloTx u pacientů v kompletní remisi AML jsme analyzovali transplantační výsledky pacientů v první nebo druhé kompletní remisi AML s normálním karyotypem a přítomností mutace NPM1 genu, kteří podstoupili aloTx a u kterých jsme jako marker monitorace MRN využili zhodnocení relativní exprese mutovaného genu NPM1 pomocí RT-PCR těsně před aloTx.

4. Pacienti a metodika

4.1 Soubor pacientů

Soubor pacientů je tvořen všemi nemocnými staršími 18 let, u kterých byla na Hematologicko-onkologickém oddělení FN Plzeň diagnostikována AML s normálním karyotypem a průkazem mutace NPM1 genu (typu A, B a D) a kteří v období 1/2005 až 9/2014 podstoupili aloTx v 1. nebo 2.KR AML. Diagnóza AML byla stanovena na základě WHO klasifikace 2008 [2] a všichni nemocní měli v době diagnózy provedeno cytogenetické vyšetření pomocí G-pruhování. Přítomnost a typ mutace genu NPM1 byla stanovena pomocí sekvenačního vyšetření včetně vyšetření vstupní relativní exprese mutovaného NPM1 genu. U všech pacientů byla též v rámci vyšetření molekulárně genetických markerů stanovena přítomnost mutace FLT3/ITD v době diagnózy AML. Hodnocení stavu kompletní remise AML bylo prováděno na základě standardních doporučení [134]. HLA typizace dárce a příjemce byla prováděně pro HLA-A, B, C a DRB1, DQB1 pomocí SSP-PCR s nízkou rezolucí v případě příbuzných a s vysokou rezolucí v případě nepříbuzných dárců v EFI akreditované laboratoři, kdy od roku 2008 bylo v případě nepříbuzného dárce prováděno též sekvenační vyšetření. Diagnóza akutní a chronické GVHD byla stanovena na základě publikovaných kritérií [322,323]. U všech pacientů po transplantaci byly hodnoceny celkové přežití (OS), přežití bez události (EFS), transplantační mortalita (TRM) a incidence relapsu. Všichni pacienti byli léčeni na základě standardních protokolů schválených radou kvality JACIE akreditovaného pracoviště a všichni pacienti vyslovili na základě Helsinské deklarace informovaný souhlas s monitorací a zpracováním dat.

4.2 Metodika detekce minimální reziduální nemoci

Odběr vzorku kostní dřeně včetně zaslání materiálu ke stanovení MRN proběhl u všech pacientů do týdne před zahájením předtransplantační přípravy. Izolace RNA ze zasláního vzorku kostní dřeně proběhla za použití komerčního kitu QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen), cDNA byla syntetizována z 500 ng RNA pomocí komerčního kitu SuperScript III First Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen).

Kvantitativní „real-time“ PCR ze získaných vzorků proběhla za použití NPM1Quant kit (Ispogen SA, Marseille, France). Kalibrační křivky pro kvantitativní zhodnocení počtu kopií sledovaného NPM1 mutovaného genu a kontrolního ABL genu byly stanovovány za využití s kitem dodávaných standardů v rámci každé analýzy. Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech a jejich průměr byl použit pro další výpočet. V případě diskrepance Ct hodnoty mezi dvěma vzorky > 0,6 cyklu byla analýza opakována. Expresa kontrolního genu ABL musela být minimálně 3000 kopií. Výsledky exprese mutovaného NPM1 genu byly vydávány jako počet kopií mutovaného NPM1 genu vztaženého na 10000 kopií kontrolního ABL genu. Amplifikace a data analýza proběhla na přístroji Light Cycler 1,5 nebo 2.0 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Vyšetření probíhalo v akreditované molekulárně genetické laboratoři a samotná metodika relativní kvantifikace mutovaného NPM1 genu byla pravidelně verifikována, validována a kontrolována v rámci externích mezilaboratorních kontrol kvality (SEKK, ÚHKT ČR).

4.3 Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena s využitím programu S.A.S. a STATISTICA (StatSoft, Inc Tulsa, OK, USA).

Deskriptivní statistika souboru pacientů byla počítána za užití standardních statistických metod (chi-kvadrát test, Fisherův exaktní test, t-test). Celkové přežití (OS) byl kalkulováno od data transplantace do úmrtí z jakékoliv příčiny a přežití bez události a přežití bez události (EFS) bylo kalkulováno od data transplantace do doby relapsu či nebo úmrtí. Žijící pacienti byli cenzorováni v době jejich poslední kontroly. Odhad funkcí přežití byl počítán metodou Kaplan-Meiera (life-product). Léčebná mortalita (TRM) byla definována jako úmrtí z příčin nesouvisejících s relapsem onemocnění. Odhad kumulativní incidence TRM a relapsu byla hodnocen metod konkurujících si rizik. K univariační analýze k zhodnocení rozdílu mezi jednotlivými skupinami pacientů byl použit long-rank test a Wilcoxonův test. K multivariační analýze byl počítán Coxův model proporcionálních rizik dle různých kritérií. Pro stanovení statistické významnosti byla použita hladina $\alpha = 0,05$.

5. Výsledky

5.1 Charakteristika souboru pacientů

Hodnocený soubor pacientů, který splňuje výše uvedená kritéria, představuje 60 transplantovaných pacientů (32 žen, 28 mužů) s mediánem věku 54 let (rozmezí 30-66 let) s AML s normálním karyotypem a průkazem mutace genu NPM1. U 32 (53%) pacientů byla v době diagnózy prokazována přítomnost mutace FLT3/ITD. Všichni pacienti podstoupili alogenní příbuzenskou (27%) nebo nepříbuzenskou (73%) transplantaci krvetvorných buněk v 1.kompletní (75%) nebo 2.kompletní (25%) remisi AML. 44 (73%) pacientů podstoupilo aloTx po redukované přípravě a 16 (27%) pacientů po myeloablativní přípravě. V případě redukované přípravy byla používána kombinace cytostatik fludarabinu (30mg/m²/den, 4dny) a melfalanu (140 mg/m²/den, 1 den) a v případě myeloablativní přípravy pak kombinace i.v.busulfanu (3,2 mg/kg/den, 4 dny) a cyklofosfamidu (60mg/kg/den, 2 dny), které byly u nepříbuzných dárců doplněny o podání ATG (ATG Fresenius S v celkové dávce 15mg/kg). Zdrojem krvetvorných buněk byla u 12 (20%) pacientů kostní dřeň a u 48 (80%) pacientů periferní krvetvorné buňky. V době transplantace byl WHO celkový stav u všech pacientů 0-1. Medián sledování po transplantaci u žijících pacientů byl 55 měsíců (rozmezí 6-101 měsíců). Jako profylaxe rozvoje nemoci z reakce štěpu proti hostiteli byla u všech pacientů podávána kombinace cyklosporinu A a metotrexátu. Charakteristiky souboru jsou shrnuty v tabulce 12.

Tabulka 12 - Charakteristika souboru pacientů

Charakteristika	
Medián věku (rozmezí), roky	54 (30-66)
Pohlaví, n (%)	
Muži	32 (53%)
Ženy	28 (47%)
Stav AML, n (%)	
1.KR	45 (75%)
2.KR	15 (25%)
Pozitivita FLT3/ITD, n (%)	32 (53%)
Typ přípravy, n (%)	
Myeloablativní	16 (27%)
Redukovaná	44 (73%)
Typ dárce, n (%)	
Příbuzný	16 (27%)
Nepříbuzný	44 (73%)
Pohlaví příjemce/dárce, n (%)	
Muž/žena	12 (20%)
Ostatní	48 (80%)
CMV stav příjemce/dárce, n (%)	
Negativní/negativní	6 (10%)
Ostatní	54 (90%)
Zdrok krvetvorných bb., n (%)	

Kostní dřeň	12 (20%)
Periferní krvevorné bb.	48 (80%)
WHO celkový stav, n (%)	
0-1	60 (100%)
≥ 2	0 (0%)

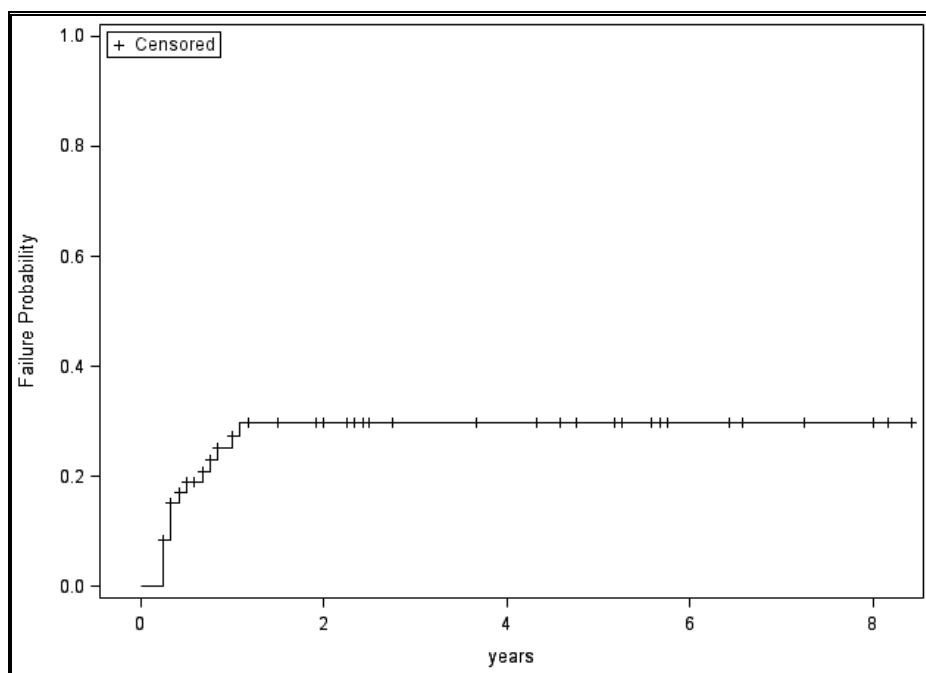
5.2 Celkové výsledky transplantovaného souboru pacientů

U všech pacientů po transplantaci došlo k přihojení štěpu a v den +30 po transplantaci u všech trvala kompletní remise AML. K rozvoji akutní nemoci z reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) došlo u 36 (60%) pacientů, k rozvoji akutní GVHD stádia III-IV pak u 8 (13%) pacientů. Chronická GVHD byla diagnostikována u 24 (40%) pacientů. Jednalo se ve 12 případech o lehké, v 8 případech středně těžké a v 4 případech o těžké stádium chronické GVHD. S mediánem sledování žijících pacientů 55 měsíců (rozmezí 6-101 měsíců) žilo v době analýzy 36 (60%) pacientů. V celém souboru 16 (27%) pacientů zrelabovalo. Medián doby od transplantace do relapsu byl 4 měsíce (rozmezí 3-13 měsíců). 13 pacientů z důvodu relapsu zemřelo, 1 pacient žije v relapsu AML a 2 dosáhli další kompletní remise, která u nich trvá 51 a 61 měsíců. Z důvodu transplantační mortality zemřelo 11 (18%) pacientů. Hlavní příčinou úmrtí (64% případů TRM) byla infekční komplikace ve spojitosti s akutní nebo chronickou GVHD. Transplantační mortalita do 1 roku byla 13%. Předpokládaný 3 letý EFS, OS, kumulativní incidence TRM a relapsu byly u celé skupiny 54%, 59%, 18% a 28%. Transplantační výsledky celého souboru pacientů jsou shrnuty v tabulce 13 a obrázku 1.

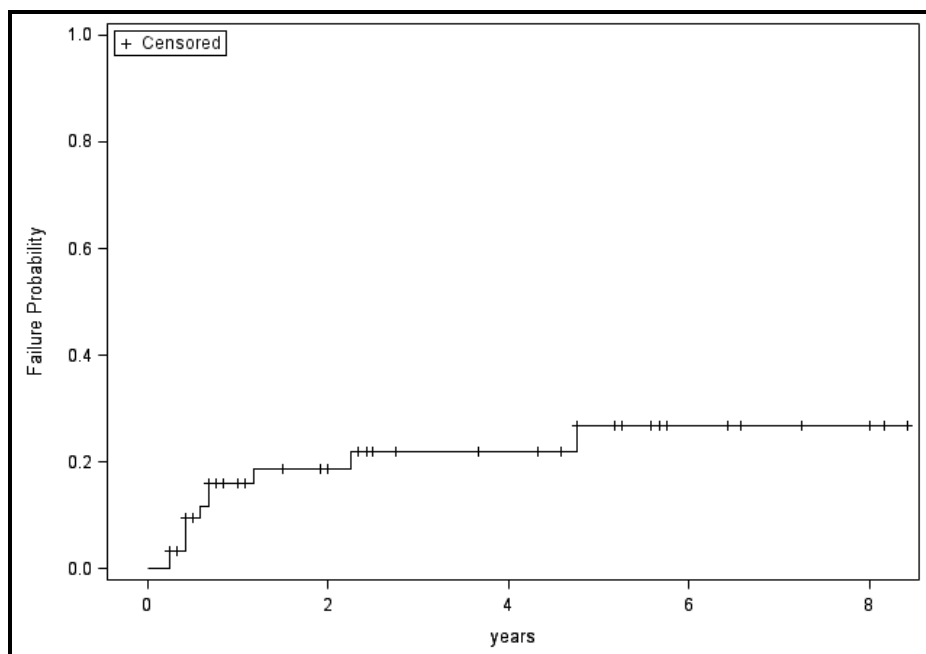
Tabulka 13 - Transplantační výsledky celého souboru pacientů

Charakteristika	
Akutní GVHD, %	60%
Akutní GVHD III-IV, %	13%
Chronická GVHD, %	40%
Lehká chronická GVHD, %	20%
Středně těžká chronická GVHD, %	13%
Těžká chronická GVHD, %	7%
3 letá kumulativní incidence relapsu, %	28%
3 letá kumulativní transplantační mortalita, %	18%
3 letý EFS	54%
3 letý OS	59%

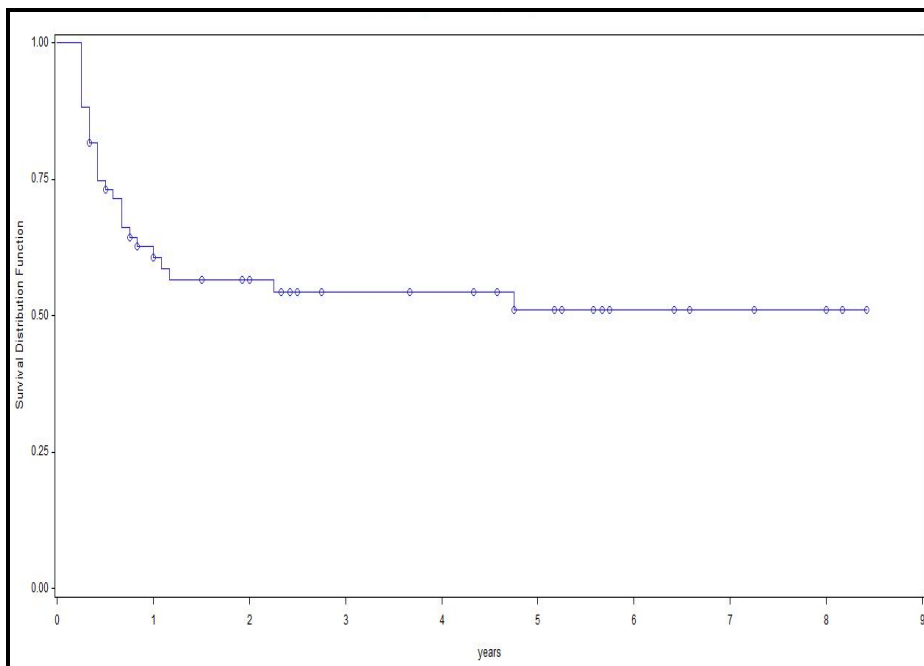
Obrázek 1 - Odhad a) kumulativní incidence relapsů b) kumulativní TRM c) EFS d) OS ve 3 letech



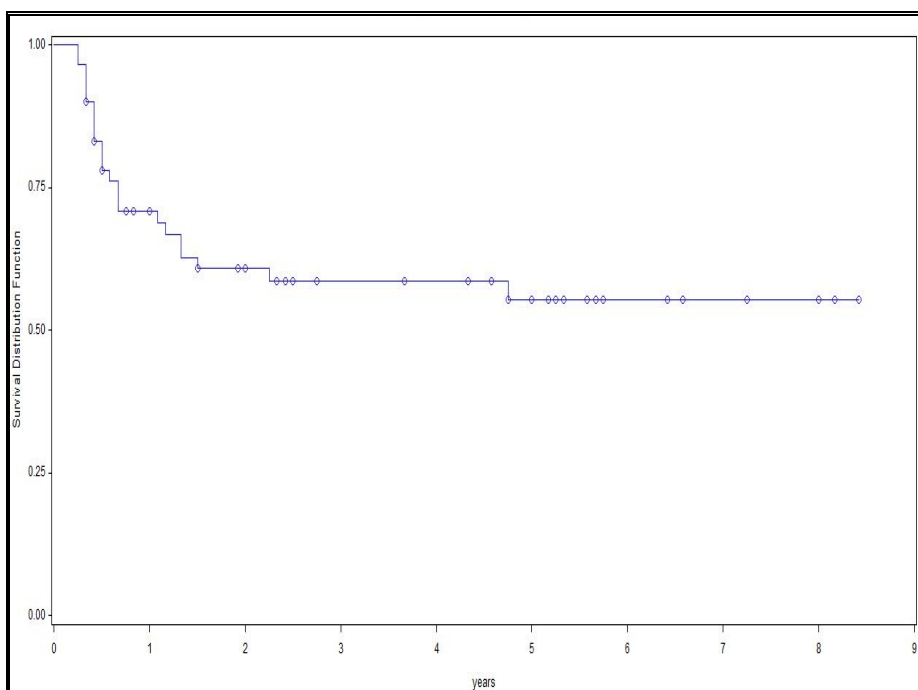
a



b



c



d

5.3 Význam vstupních prognostických markerů na transplantační výsledky

V rámci uvedených celkových výsledků jsme se následně snažili ověřit význam jednotlivých vstupních předtransplantačních prognostických faktorů na transplantační výsledky ve smyslu ovlivnění EFS a OS. K hodnoceným vstupním faktorům patřil věk

pacienta, stav základního onemocnění, přítomnost FLT3/ITD v době diagnostiky AML, typ a pohlaví dárce, CMV stav dárce a příjemce, zdroj krvevorných buněk, typ předtransplantační přípravy a pozitivita reziduální nemoci před zahájením předtransplantační přípravy. V rámci univariační analýzy uvedených vstupních prognostických faktorů pouze věk nad 63 let a hladina reziduální nemoci (nejvyšší statistická významnost při hladině > 10 kopií NPM1 mutovaného genu na 10000 kopií ABL genu) prokazovaly statisticky signifikantní negativní vliv na EFS a OS. Trend k negativnímu ovlivnění EFS a OS pak měla provedení transplantace v 2.KR AML a kombinace pozitivního sérologického stavu CMV stavu dárce i příjemce. Univariantní analýza faktorů ovlivňujících EFS a OS je shrnuta v tabulkách 14 a 15.

Tabulka 14 - Univariační analýza faktorů ovlivňujících EFS

Faktor	HR	95%CI	p
Věk > 63 let	3,40	1,24-9,62	0,0341
NPM1 > 10 kopií/10000kopií ABL	3,69	1,60-8,51	0,0021
FLT3/ITD pozit.	1,29	0,60-2,78	0,51
KR2 vs KR1	1,72	0,77-3,87	0,19
Redukovaná vs. myeloablat. příprava	1,14	0,48-2,71	0,76
Nepříbuzný vs. příbuzný dárce	0,98	0,42-2,32	0,97
BM vs PBSC	1,18	0,50-2,81	0,70
Příjemce muž/dárce žena vs. ostatní	1,00	0,38-2,66	0,99
CMV dárce/příjemce pozit. vs. ostatní	2,16	0,97-4,83	0,06

Tabulka 15 - Univariační analýza faktorů ovlivňujících OS

Faktor	HR	95%CI	p
Věk > 63 let	5,40	1,82-16,02	0,0071
NPM1 > 10 kopií/10000kopií ABL	3,50	1,40-8,47	0,0034
FLT3/ITD pozit.	1,05	0,47-2,34	0,90
KR2 vs KR1	1,92	0,82-4,49	0,13
Redukovaná vs. myeloablat. příprava	1,71	0,63-4,58	0,29
Nepříbuzný vs. příbuzný dárce	1,22	0,45- 2,83	0,81
BM vs PBSC	1,09	0,43-2,74	0,86
Příjemce muž/dárce žena vs. ostatní	1,77	0,53-5,95	0,35
CMV dárce/příjemce negat. vs. ostatní	1,75	0,76-3,99	0,18

Provedená multivariační analýza za hodnocení uvedených vstupních faktorů potvrdila statisticky signifikantní negativní prognostický vliv věku nad 63 let a hladiny reziduální nemoci (nejvyšší statistická významnost při hladině > 10 kopií NPM1 mutovaného genu na 10000 kopií ABL genu) na EFS a OS. Výsledky multivariační analýzy jsou shrnuty v tabulce 16 a 17.

Tabulka 16 - Multivariační analýza faktorů ovlivňujících EFS

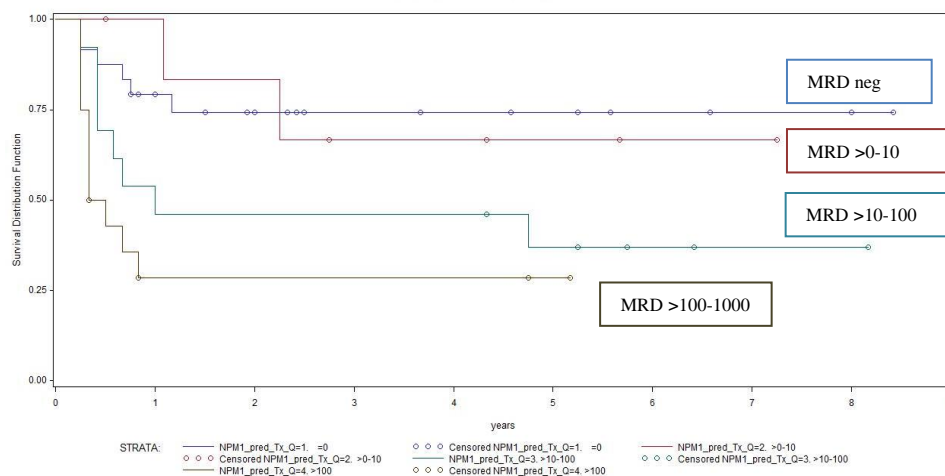
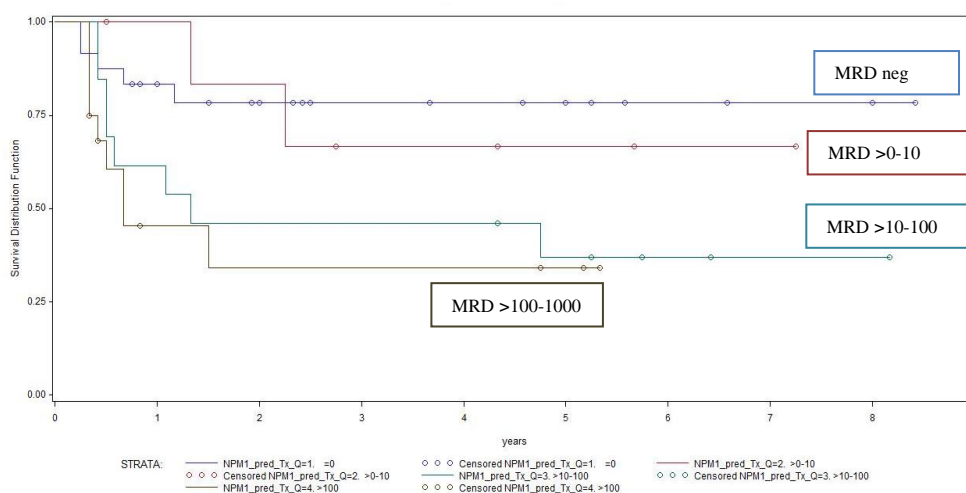
Faktor	HR	95%CI	p
Věk > 63 let	3,40	1,24-9,62	0,0341
NPM1 > 10 kopií/10000kopií ABL	3,69	1,60-8,51	0,0021

Tabulka 17 - Multivariantní analýza faktorů ovlivňujících OS

Faktor	HR	95%CI	p
Věk > 63 let	6,23	1,99-19,48	0,0017
NPM1 > 10 kopií/10000kopií ABL	3,71	1,52-9,06	0,0040

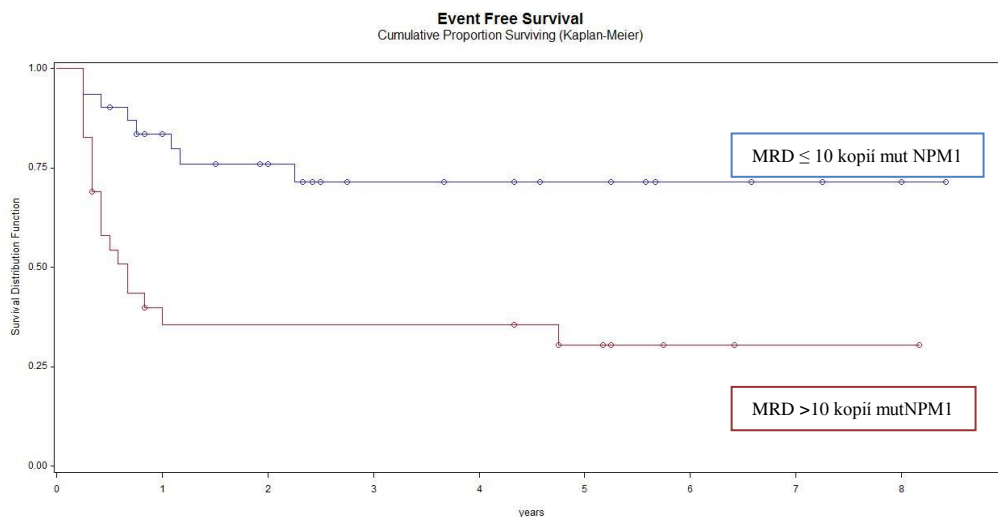
5.4 Význam vstupních hladiny reziduální nemoci na transplantační výsledky

Vzhledem ke znalosti relativní exprese NPM1 mutovaného genu v době diagnózy AML (medián 38245 kopií mutovaného NPM1/10000 kopií ABL, rozmezí 14350-144707 kopií mutovaného NPM1/10000 kopií ABL) bylo pro výběr hodnocení hladiny reziduální nemoci v době před transplantací možno využít 2 způsoby jejího hodnocení. Jednak relativní hodnota exprese mutovaného NPM1 genu v době před transplantací nebo zhodnocení poklesu relativní exprese mutovaného NPM1 mezi dobou vstupní diagnostiky AML a relativní exprese v době před transplantací. Vyšší statistické signifikance dosahovalo využití rozdělení hladiny minimální reziduální nemoci na základě samotné hodnoty relativní exprese mutovaného NPM1 genu před transplantací a jako cut off byla vybrána hodnota 10 kopií mutovaného NPM1 genu na 10000 kopií ABL genu, která soubor rozdělovala na 2 skupiny se statisticky nejvýznamnějším rozdílem EFS a OS, i když signifikance bylo dosaženo pro několik hodnot cut off, což ukazují obrázek 2 a 3.

Obrázek 2 - Pravděpodobnost EFS na základě hladiny MRD před transplantací**Obrázek 3 - Pravděpodobnost OS na základě hladiny MRD před transplantací**

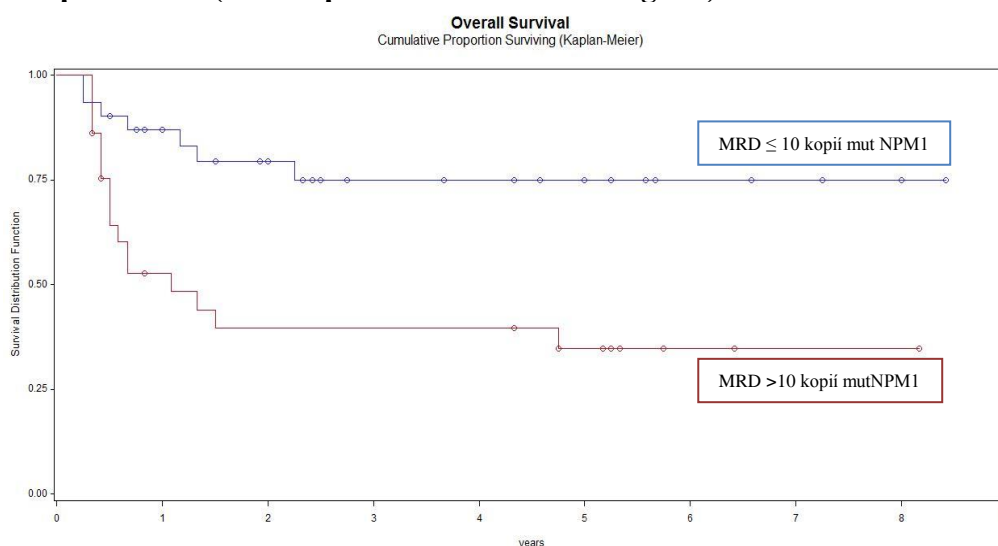
Na základě rozdělení souboru sledovaných pacientů podle vstupní hladiny MRN (\leq vs >10 kopií mutovaného NPM1 genu/10000 kopií ABL genu) lze sledovat rozdíl ve výsledcích provedené alogenní transplantace, kdy v celém souboru 16 (27%) pacientů zrelabovalo, z čehož u pacientů s „vyšší vstupní MRN“ se jednalo o 14 pacientů (48%) a u pacientů s „nízkou vstupní MRN“ pouze o 2 pacienty (6%). Z důvodu transplantace mortality zemřelo celkově 11 (18%) pacientů, kdy ve skupině s „vyšší vstupní MRN“ se jednalo o 5 pacientů (17%) a ve skupině s „nízkou vstupní MRN“ o 6 pacientů (19%). Předpokládaný 3 letý EFS a OS u celé skupiny nemocných byl 54% a 59%. Riziko relapsu nebo úmrtí bylo ve skupině nemocných s „vyšší vstupní MRN“ 3,69x vyšší než ve skupině pacientů s „nízkou vstupní MRN“ (HR = 3,69; 95% CI 1,52-9,06). Předpokládaný 3 letý EFS byl u skupiny pacientů s „vyšší vstupní MRN“ 35% a tedy signifikantně horší než u skupiny pacientů s „nízkou vstupní MRN“, kde byl 3 letý EFS 72% ($p = 0,0021$), což znázorňuje obrázek 4.

Obrázek 4 - Pravděpodobnost EFS na základě rozdělení sledovaného souboru na pacienty s „nízkou vstupní MRN“ (≤ 10 kopií mutovaného NPM1 genu) a „vyšší vstupní MRN“ (> 10 kopií mutovaného NPM1 genu)



Riziko úmrtí bylo ve skupině nemocných s „vyšší vstupní MRN“ 3,71x vyšší než ve skupině pacientů s „nízkou vstupní MRN“ (HR = 3,71; 95% CI 1,60-8,51). Předpokládané 3 leté celkové přežití bylo pak u skupiny pacientů s „vyšší vstupní MRN“ 40% a tedy signifikantně horší než u skupiny pacientů s „nízkou vstupní MRN“, kde bylo předpokládané 3 leté celkové přežití po transplantaci 75% ($p = 0,004$), což znázorňuje obrázek 5.

Obrázek 5 - Pravděpodobnost EFS na základě rozdělení sledovaného souboru na pacienty s „nízkou vstupní MRN“ (≤ 10 kopií mutovaného NPM1 genu) a „vyšší vstupní MRN“ (> 10 kopií mutovaného NPM1 genu)



Transplantační výsledky souboru pacientů rozděleného na základě hladiny vstupní MRN pak shrnuje tabulka 18.

Tabulka 18 - Shrnutí transplantačních výsledků na základě rozdělení sledovaného souboru na pacienty s „nízkou vstupní MRN“ (≤ 10 kopií mutovaného NPM1 genu) a „vyšší vstupní MRN“ (> 10 kopií mutovaného NPM1 genu)

	NPM1 ≤ 10 kopií/10000 kopií ABL	NPM1 > 10 kopií/10000 kopií ABL
3 letá incidence relapsu	6%	48%
3 letý EFS	72%	35%
3 letý OS	75%	40%

6. Diskuze

Provedení aloTx je v současné době nejúčinnější léčebnou modalitou u AML, kdy v posledních letech díky hlubší znalosti imunologických dějů spojených s transplantací, zlepšením HLA typizace, využitím nových imunosupresivních léků, začleněním redukovaných přípravných režimů, zlepšením podpůrné péče včetně zavedení nových léků a léčebných přístupů došlo k významnému poklesu transplantační mortality a rozšíření spektra pacientů, kterým může být aloTx provedena [227,248,313,314]. Při zlepšování transplantačních postupů pak zůstává relaps AML po aloTx zásadní limitací výsledků transplantace i vzhledem k vysoce nepříznivé prognóze zrelabovaných pacientů [241]. Z tohoto důvodu je vyvíjena snaha o identifikaci faktorů, které mohou zvyšovat riziko relapsu AML po transplantaci a jejichž poznání by mohlo pomoci vyselektovat skupiny rizikových pacientů, kteří by byly adepty další intervence snižující riziko relapsu AML po aloTx.

V rámci standardní cytostatické léčby AML se na základě publikovaných dat zdá, že jedním z prognosticky nezávislých faktorů ovlivňujících riziko relapsu AML je detekce MRN [139,140,144,145,146,147,148,149,150,151,155, 156,157]. V případě aloTx je pak význam stanovení MRN intenzivně zkoumán a dosud publikované práce obvykle využívající k detekci MRN multiparametrovou průtokovou cytometrii (MFCM) ukazují, že stanovení hladiny MRN před alogenní transplantací může mít prognostický význam pro výsledek transplantace. Limitací těchto publikací je však obvykle menší velikost souboru pacientů, zastoupení různých typů AML, různá diagnostická metodika stanovení MRN a také fakt, že ne všechny práce prognostický význam MRN dokládají [315,316,317, 318,319,320,321,331]. K dalším limitacím hodnocení významu hladiny MRN před alogenní transplantací je fakt, že rozsah publikovaných studií je zatím velmi omezený.

V našem menším, ale stran diagnózy i léčby homogenním souboru nemocných, což je rozdíl oproti výše uvedeným již publikovaným studiím, jsme se pokusili ověřit vliv předtransplantační hladiny MRN na výsledek aloTx u pacientů s AML s normálním karyotypem a mutací NPM1 genu v 1. nebo 2.KR AML. K hodnocení MRN byla využita relativní exprese mutovaného genu NPM1 pomocí standardizované RT-PCR. Využití mutace NPM1 genu bylo v řadě publikací doloženo jako vhodný a stabilní marker pro detekci MRN [144,145,146,147, 324, 325,333]. Výsledky našeho souboru pacientů patří k největším souborům nemocných s AML, kde byl hodnocen význam stanovení předtransplantační hladiny MRN na výsledek alogenní transplantace krvetvorných buněk pomocí kvantifikace exprese mutovaného genu NPM1. Využití RT-PCR díky jasnému molekulárně genetickému markeru u naší skupiny pacientů pak ve srovnání s obvykle využívanou MFCM eliminuje některé limitace průtokové cytometrie a to především nižší senzitivitu a riziko antigenních změn na leukemických buňkách [153,154,319,326]. Stanovení hladiny MRN probíhalo těsně (do týdne) před zahájením předtransplantační přípravy, což omezuje riziko chyby v určení hladiny MRN při možné rychlé kinetice jejích změn v případě AML [327,328]. V jiných publikovaných studiích není doba vyšetření MRN před transplantací upřesněna nebo byl její interval delší než v případě našeho souboru pacientů [320,329]. Homogenitu našeho souboru pacientů dále podporuje fakt, že předtransplantační cytostatická příprava byla totožná v rámci skupiny myeloablativně (kombinace busulfanu s cyklofosfamidem) tak redukovaně (kombinace fludarabinu s melfalanem) transplantovaných pacientů. Též profylaxe rozvoje nemoci z reakce štetu proti hostiteli byla u všech pacientů identická (kombinace cyklosporinu A a methotrexátu).

Výsledky analýzy našeho souboru pacientů ukazují, že hladina MRN v období před aloTx u pacientů s AML s normálním karyotypem a mutací NPM1 genu v 1. nebo 2.KR je nezávislým prognostickým faktorem, který predikuje výsledek aloTx. Námi získané výsledky tedy dále podporují závěry většiny dosud publikovaných prací o významu stanovení MRN na výsledek aloTx u AML [315,316,317,318,319,320,329, 330].

Vzhledem ke znalosti relativní exprese NPM1 mutovaného genu v době diagnózy AML (medián 38245 kopií mutovaného NPM1/10000 kopií ABL, rozmezí 14350-144707 kopií mutovaného NPM1/10000 kopií ABL) bylo pro výběr hodnocení hladiny reziduální nemoci v době před transplantací možno využít 2 způsoby jejího hodnocení. Jednak relativní hodnota exprese mutovaného NPM1 genu v době před transplantací nebo zhodnocení poklesu relativní exprese mutovaného NPM1 mezi dobou vstupní diagnostiky AML a relativní exprese v době před transplantací u každého jednoho pacienta. Vyšší statistické signifikance dosahovalo využití rozdělení souboru pacientů na základě samotné hodnoty relativní exprese mutovaného NPM1 genu před transplantací. Uvedený fakt si vysvětlujeme až 10 násobným rozdílem v expresi mutovaného NPM1 genu v době diagnózy. Statistické významnosti bylo dosaženo pro několik hladin exprese mutovaného NPM1 genu před transplantací (neg. vs. pozitivní a dále < nebo > než 1,10,100 kopií mutovaného NPM1/10000 ABL genu), z čehož lze usuzovat, že s narůstající hladinou předtransplantační MRN se zhoršují výsledky aloTx (EFS, OS), což je v určitém rozporu s některými publikacemi, které dokládaly rozdílné výsledky aloTx jen v případě positivity či negativity MRN a v rámci MRN pozitivních pacientů již nebyl prokazován význam hladiny positivity na výsledek aloTx [315,317]. Toto lze v těchto studiích vysvětlit citlivostí použité metodiky ke stanovení MRN (MFCM) a nižším počtem MRN pozitivních pacientů, kdy při jejich dalším rozdělení již různá hladina MRN nedosahovala statistické významnosti [315,317]. V případě našeho souboru pacientů byla jako cut off vybrána hodnota 10 kopií mutovaného NPM1 genu na 10000 kopií ABL (0,1% mutovaného NPM1/ABL), která soubor rozdělovala na 2 skupiny se statisticky nejvýznamnějším rozdílem EFS a OS, který byl doložen i multivariační analýzou.

Pacienti s AML s normálním karyotypem v morfoloické 1. nebo 2.KR a vyšší hladinou předtransplantační MRN (> 10 kopií mutovaného NPM1/ 10000 kopií ABL) měli vyšší incidenci relapsu a horší EFS a OS po transplantaci. Při srovnání pacientů s vyšší a nižší hladinou předtransplantační MRN byl 3 letý EFS 35% u pacientů s „vyšší hladinou MRN“ ve srovnání s 3 letým EFS 72% u pacientů s „nižší hladinou MRN“ před transplantací. Podobně byl 3 letý OS 40% u pacientů s „vyšší hladinou MRN“ ve srovnání s 3 letým OS 75% u pacientů s „nižší hladinou MRN“ před transplantací. Incidence relapsů pak byla ve skupině pacientů s „vyšší hladinou MRN“ 48% ve srovnání s incidencí relapsů 6% u skupiny pacientů s „nižší hladinou MRN“ před transplantací. Transplantační mortalita se mezi oběma skupinami pacientů statisticky nelišila.

Zajímavým zjištěním u námi publikovaného souboru pacientů je fakt, že přítomnost FLT3/ITD neměla u pacientů s AML s normální karyotypem a mutací NPM1 genu v KR nepříznivý vliv na transplantační výsledky. V případě AML s normálním karyotypem a NPM1 mutací vstupní diagnostická pozitivita FLT3/ITD dle publikovaných studií zhoršuje prognózu těchto pacientů [64, 72,327,332]. Při zohlednění hladiny MRN se dle námi zjištěných výsledků zdá, že prognostický význam FLT3/ITD positivity je minimální v kontextu výsledků aloTx při srovnání pacientů s AML s mutací NPM1 genu v KR s nebo bez FLT3/ITD positivity v době diagnózy. Tento námi zjištěný fakt je podporován i výsledky některých dalších autorů [333]. Podobně v našem souboru pacientů neměl při zohlednění předtransplantační hladiny MRN na transplantační výsledky vliv stav KR AML

a výsledky aloTx u pacientů s AML s normálním karyotypem a mutací NPM1 genu v 1.KR se statisticky nelišily od výsledků pacientů v 2.KR. Podobné závěry učinily i některé další studie, které v rámci hodnocení transplantačních výsledků zohledňovaly přítomnost předtransplantační MRN [315,317,319]. Nicméně v rámci objektivitu nemůžeme v tomto případě vyloučit vliv menšího souboru námi sledovaných pacientů, protože jsme zaznamenali určitý trend k horším transplantačním výsledkům u pacientů v 2.KR, který však nedosahoval statistické signifikance. Tuto nejistotu podporují i výsledky recentně publikované studie výsledků aloTx u pacientů s AML a izolovanou mutací NPM1 genu, které dokladovaly horší transplantační výsledky u pacientů v 2.KR ve srovnání s pacienty v 1.KR, nicméně v této studii nebyla zohledněna hladina předtransplantační MRN [334]. V rámci hodnocení výsledku našeho souboru pacientů je nutné ještě zmínit vliv intenzity předtransplantační cytostatické přípravy na transplantační výsledky námi sledovaného souboru pacientů, protože intenzitu přípravného protokolu můžeme do určité míry na rozdíl od jiných potenciálních vstupních faktorů (např. typ dárce, jeho pohlaví apod.) ovlivnit. V rámci našeho souboru pacientů s AML s normálním karyotypem a mutací NPM1 genu v 1. nebo 2.KR nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi pacienty transplantovanými po myeloablativní (busulfan v kombinaci s cyklofosfamidem) nebo redukované (fludarabin v kombinaci s melfalanem) přípravě. Toto zjištění, je podpořeno i výsledky některých dalších studií, kdy výsledky alogenní transplantace u AML v KR nebyly ovlivněny typem přípravy, ale pouze pozitivitou předtransplantační MRN [315,316,317,318]. Nicméně obecně je na základě publikovaných dat redukovaná předtransplantační příprava spojována s vyššími riziky relapsu AML po transplantaci ve srovnání s myeloablativními režimy včetně některých publikací, které zohledňovaly i stav MRN před transplantací a které dokladovaly lepší transplantační výsledky v případě použití myeloablativní přípravy u pacientů s pozitivitou MRN před aloTx [283,284,285,331]. V našem souboru pacientů též žádné další potenciální prognostické faktory (typ dárce, pohlaví dárce, typ štěpu, CMV status dárce) neovlivňovaly se statistickou významností výsledek transplantace s výjimkou věku pacienta nad 63 let, kdy 3 letý EFS a OS byl 38%, což však bylo ovlivněno vyšší transplantační mortalitou (38%) těchto starších pacientů. Lze tedy shrnout, že námi publikované výsledky podporují prognostický význam stanovení předtransplantační hladiny MRN na výsledek aloTx u pacientů s AML v KR a jsou tedy ve shodě s většinou dosud publikovaných prací. Z praktického hlediska můžeme tedy v našem souboru pacientů vybrat skupinu nemocných s nízkou hladinou MRN, jejichž 3 leté celkové přežití po transplantaci je 75% díky nízké incidenci relapsu, která v našem souboru u těchto nemocných činila 6%. Podobné výsledky můžeme nalézt i u dalších studií, kdy u pacientů s negativitou MRN před transplantací je publikované 3 leté celkové přežití mezi 62-77% a incidence relapsu mezi 0-21% [315,316,317,320]. U této skupiny pacientů je tedy přítomno nízké riziko relapsu AML a pro výsledek aloTx je pro tyto nemocné rozhodující transplantační mortalita, morbidita a kvalita života. Lze tedy u těchto nemocných zvažovat o preferenčním využití redukovaných přípravných režimů ke snížení toxicity transplantační léčby, účinnější prevenci GVHD a pomalejšímu ukončování imunosupresivní léčby ke snížení rizik rozvoje GVHD jako hlavní příčiny morbidita a mortality po aloTx. Nicméně tyto přístupy je nutné ověřit v rámci dalších studií. Provokativní otázkou může být dokonce vůbec nutnost zařazení aloTx do léčby těchto nemocných při zohlednění některých recentně publikovaných dat [333]. Na druhou stranu můžeme v našem souboru vyčlenit skupinu pacientů s vyšší předtransplantační hladinou MRN, jejichž prognóza je horší. V našem souboru tyto pacienti měli 3 leté celkové přežití 40% a incidenci relapsů 48%. Podobné výsledky můžeme opět nalézt i u dalších studií, kdy

u pacientů s pozitivitou MRN před transplantací je publikované 3 leté celkové přežití mezi 18-47% a incidence relapsu mezi 41-70% [315,316,317,320]. Výsledky pacientů s pozitivitou MRN před transplantací jsou tedy statisticky významně horší než bez positivity MRN. Přítomnost MRN v rámci standardní cytostatické léčby AML byla řadou prací doložena jako nezávislý prognostický nepříznivý faktor [109,140,144,145,146,148,149,150,157,333]. Pozitivitu MRN u AML v rámci standardní cytostatické léčby lze tedy považovat za nezávislou nepříznivou biologickou charakteristiku onemocnění. Výsledky standardní léčby u pacientů s pozitivitou MRN při samotné cytostatické léčbě jsou vysoce nepříznivé. Jedna z posledních rozsáhlejších publikací věnující se právě pacientům s AML s NPM1 mutací udává u pacientů s přetrvávající pozitivitou NPM1 exprese po 2 cyklech léčby 3 leté přežití 24% [333]. Při zohlednění našich a dalších publikovaných výsledků pacienti s AML v KR a pozitivitou MRN před transplantací dosahují 3 letého celkové přežití cca 40% a lze tedy usuzovat, že aloTx u pacientů v morfologické remisi AML s pozitivitou MRN částečně zlepšuje jejich nepříznivou prognózu ve srovnání s pouhou cytostatickou léčbou. V současné době zatím zůstává nejasná odpověď na otázku, zda lze dále zlepšit transplantační výsledky u pacientů s AML v KR a pozitivitou MRN. V rámci této potenciálně rizikové skupiny pacientů lze zvažovat několik možných postupů k ovlivnění výsledku aloTx. V úvahu připadá možnost, v případě trvající positivity MRN v rámci standardní cytostatické léčby AML, se pokusit další cytostatickou léčbou o dosažení negativity MRN. Nicméně tento postup může být problematický. Naše zkušenosti (nepublikovaná data) u nemocných s AML a NPM1 pozitivitou, kterým je monitorována MRN v průběhu indukční a následné konsolidační léčby ukazují, že u části pacientů s další konsolidací (vysoké dávky cytosinarabinosidu) již nedochází k poklesu hladiny MRN a u některých dokonce po další konsolidační léčbě hladina MRN vzrostla. Podobnou zkušenost publikovali i italští autoři, kdy u části pacientů s AML a MRN pozitivitou po indukční léčbě nedošlo k dosažení MRN negativity a u některých docházelo k její progresi po podání dalších 2 cyklů konsolidační chemoterapie (idarubicin v kombinaci s nižšími intermediárními dávkami cytosin arabinosidu) [335,336]. Další problematickým místem tohoto přístupu jsou samotná rizika léčebné morbidity a mortality v souvislosti s další intenzivní cytostatickou léčbou, která mohou ohrozit provedení samotné aloTx nebo zhoršit její výsledky. Další možností k ovlivnění prognózy výsledku aloTx u MRN pozitivních pacientů s AML je využití intenzivnějšího (myeloablativní) předtransplantačního přípravného protokolu. Nicméně v rámci námi publikovaného souboru pacientů při zohlednění předtransplantační hladiny MRN intenzita cytostatické přípravy neovlivňovala výsledky provedené aloTx. Podobné výsledky pak byly publikovány v rámci studie autorů ze Seatllu hodnotící význam MRN u AML v 1. nebo 2.KR v souvislosti s použitou intenzitou předtransplantační přípravy, kdy pacienti s MRN pozitivitou měli riziko relapsu v případě myeloablativní přípravy 63% a v případě nemyeloablativní přípravy 57%. [317]. Naopak některé publikace, jak již bylo výše uvedeno význam intenzity předtransplantační přípravy podporují [283,284,285,331]. Nicméně je zde nutno uvést opakovaně publikovaný fakt, že vyšší intenzita předtransplantační přípravy je spojena s vyšším rizikem transplantační mortality, takže finálně potenciální dosažení nižšího rizika relapsu se nemusí promítnout do výsledku celkového přežití pacientů po aloTx [286]. K dalším možnostem ovlivnění výsledků aloTx u pacientů s AML v KR a pozitivitou MRN je snaha o zvýšení imunologické odpovědi tedy reakce štěpu proti leukémií (GvL), ať už časnou potransplantační redukcí imunosupresivní léčby nebo podáním preemptivní infuze dárcovských lymfocytů. Na základě našich a dalších publikovaných výsledků se v rámci našich pacientů s AML v KR a s vyšší hladinou MRN

snážíme aktuálně o časnou redukci imunosupresivní léčby k potenciaci GvL efektu. Zdá se, že uvedený postup vede k nižšímu riziku relapsu, ale náš soubor takto nemocných bude teprve podroben hlubší analýze. Nicméně v literatuře lze nalézt publikace, které dokládají efektivitu tohoto přístupu [337,338]. Podobně je v poslední době atraktivní přístup kombinující výše uvedenou potenciaci GvL efektu s podáním léků ať už standardních cytostatik nebo nových cílených léků (demetylační látky, protilátky, inhibitory tyrosinkináz apod.). Největší publikované zkušenosti v poslední době se týkají využití azacytidinu nebo deoxyazacytidinu s jejich potenciální efektivitou v rámci preemptivní léčby možného relapsu AML po aloTx [339,340,341]. Jedná se však zatím jen o menší studie a dosud není žádná standardní potransplantační (preemptivní) léčba AML obecně doporučena. Námi získané výsledky u námi publikovaného souboru pacientů, kdy u pacientů s AML v KR a vyšší hladinou MRN docházelo k relapsu s mediánem 4 měsíců po alogenní transplantaci, ukazují, že eventuální terapeutickou intervencí po aloTx je třeba zahájit časně při zjištěném poměrně vysokém riziku časného relapsu AML po transplantaci.

Obecně lze tedy říci, že horší výsledky aloTx u pacientů s AML a pozitivitou MRN otevírají výzkumné pole pro snahu o identifikaci dalších negativních prognostických faktorů v rámci této skupiny pacientů a zahájení intervenčních prospektivních studií, které se pokusí dále ověřit přínos výše uvedených možných terapeutických kroků ke zlepšení prognózy těchto nemocných.

7. Závěr

Autor prokázal:

1. U pacientů před alogenní transplantací krvinek pro AML s normálním karyotypem a mutací NPM1 genu v kompletní remisi byla prokazována pomocí kvantitativní PCR různá hladina minimální reziduální nemoci.
2. Stanovení hladiny minimální reziduální nemoci pomocí kvantitativní PCR s relativní kvantifikací mutovaného NPM1 genu vůči kontrolnímu ABL genu je vhodným, přesným, senzitivním a stabilním způsobem její detekce.
3. Hladina minimální reziduální nemoci stanovená pomocí relativní kvantifikace mutovaného NPM1 genu vůči kontrolnímu ABL genu před zahájením předtransplantační cytostatické přípravy statisticky signifikantně prognosticky ovlivňovala výsledky alogenní transplantace krvinek.
4. Samotná hodnota hladiny minimální reziduální nemoci před alogenní transplantací lépe stratifikovala prognózu nemocných než hodnocení poklesu hladiny relativní exprese od diagnózy do doby transplantace.
5. Statistická významnost byla doložena pro různou úroveň zjištěných hladin minimální reziduální nemoci před alogenní transplantací krvinek.
6. Hodnota 10 kopií mutovaného NPM1 genu na 10000 kopií kontrolního ABL genu soubor rozdělovala na 2 skupiny se statisticky nejvýznamnějším rozdílem EFS a OS.
7. Hladina minimální reziduální nemoci před alogenní transplantací krvinek u pacientů s AML s normálním karyotypem a mutací NPM1 genu v kompletní remisi si zachovávala prognostický význam i při zahrnutí dalších vstupních předtransplantačních prognostických markerů.
8. V rámci sledovaného souboru pacientů neovlivnily výsledky alogenní transplantace další významné vstupní parametry, kdy se jedná především o současnou přítomnost FLT3/ITD mutace či intenzitu předtransplantační cytostatické přípravy.
9. Jako součást dizertační práce jsou předkládány resp. diskutovány možnosti ovlivnění horších transplantačních výsledků u pacientů s vyšší hladinou minimální reziduální nemoci před transplantací.

8. Použitá literatura

- [1] ADAM, Z., KREJČÍ, M. a VORLÍČEK, J. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2502-4.
- [2] SWERDLOW, S. H. (ed.). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. ISBN 978-92-832-2431-0.
- [3] DESCHLER, B., LÜBBERT, M. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer*, 2006, vol. 107, no.9, s. 2099-2107. ISSN 1097-0142
- [4] HOWLADER, N., NOONE, A.M., KRACHPO M., et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute Bethesda. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/ (přístup listopad 2013)
- [5] APPELBAUM, F.R., GUNDACKER, H., HEAD D.R., et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 2006, vol. 107, no.9, s. 3481-3485. ISSN 0006-4971
- [6] JEMAL, A., THOMAS, A., MURRAY, T., et al. Cancer statistics 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2002, vol.52, no.1, s. 23-47. ISSN 1542-4863
- [7] THOL, F., GANSER, A. Molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia: a diverse disease with new perspectives. *Frontiers of Medicine*, 2010, vol. 4, no.4, s. 356-362. ISSN 2095-0225
- [8] FONG, C.T., BRODEUR, G.M. Down's syndrome and leukemia epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1987, vol. 28, no. 1, s. 55-76. ISSN 0165-4608
- [9] AGUINO, V.S. Acute Myelogenous Leukemia. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 2002, vol. 32, no.2, s. 50-58. ISSN 1538-5442
- [10] DOUER, D., SANTILLANA, S., RAMEZANI, L., et al. Acute promyelocytic leukemia in patients originating in Latin America is associated with an increased frequency of the bcr1 subtype of the PML/RARalpha fusion gene. *British Journal of Haematology*, 2003, vol.122, no.4, s. 563-570. ISSN 1365-2141
- [11] DOUER, D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 2003, vol. 16, no. 3, s. 357-367. ISSN 1521-6926
- [12] BOWEN, D.T., FREW, M.E., ROLLINSON, S., et al. CYP1A12B (Val) allele is overrepresented in subgroup of acute myeloid leukemia patients with poor-risk karyotype associated with NRAS mutation, but not associated with FLT3 internal tandem duplication. *Blood*, 2003, vol. 101, no.7, s. 2770-2774. ISSN 0006-4971
- [13] LARSON, R.A., WANG, Y., BANERJEE, M., et al. Prevalence of the inactivating 609 C-T polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*, 1999, vol. 91, no.2, s. 1422-1426. ISSN 0006-4971
- [14] SMITH, M.T., WANG, Y., KANE, E., et al: Low NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute myeloid leukemia in adults. *Blood*, 2001, vol. 91, no.5, s. 1422-1426. ISSN 0006-4971

- [15] PRESTON, D.L., KUSUMI, S., TOMONAGA, M., et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiation Research*, 1994, vol. 137, no. 2, s. 68-97. ISSN 0033-7587
- [16] KOSSMAN, S.E., WEISS, M.A. Acute myelogenous leukemia after exposure to strontium-89 for treatment of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, 2000, vol. 88, no.3, s. 620-624. ISSN 1097-0142
- [17] LE BEAU, M.M., ALBAIN, K.S., LARSON, R.A., et al. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes 5 and 7. *Journal of Clinical Oncology*, 1986, vol. 4, no. 3, s. 325-345. ISSN 1527-7755
- [18] PUI, Ch., RIBEIRO, R.C., HANCOCK, M.L., et al. Acute myeloid leukemia in children treated with epidolophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1991, vol. 325, no. 24, s. 1682-1687. ISSN 1533-4406
- [19] PEDERSEN-BJERGAARD, J., PHILIP, P., LARSEN, S.O., et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Cytogenetics characteristics of 115 consecutive cases and risk in seven cohorts of patients treated intensively for malignant diseases in the Copenhagen series. *Leukemia*, 1993, vol. 7, no. 12, s.1975-1986. ISSN 1476-5551
- [20] SAVITZ, D.A., ANDREWS, K.W. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *American Journal of Industrial Medicine*, 1997, vol. 31, no.3, s. 287-295. ISSN 1097-0274
- [21] POGODA, J.M., PRESTON-MARTIN, S., NICHOLS, P.W., et al. Smoking and risk of acute myeloid leukemia results from Los Angeles County case control study. *American Journal of Epidemiology*, 2002, vol. 155, no. 6, s. 546-553. ISSN 1476-6256
- [22] DASH, A., GILLILAND, D.G. Molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 2001, vol. 14, no. 1, s. 49-64. ISSN 1521-6926
- [23] MAWAD, R., ESTEY, E.H. Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics. *Current Oncology Report*, 2012, vol. 14, no.5, s 359-368. ISSN 1534-6269
- [24] SANDERS, M.A., VALK, P.J., et al. The evolving molecular genetics landscape in acute myeloid leukaemia. *Current Opinion in Hematology*, 2013, vol. 20, no. 2, s. 79-85. ISSN 1531-7048
- [25] LEY, T.J., MARDIS, E.R., DING, L., et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, 2008, vol. 456, no.7218, s. 66-72. ISSN 1476-4687
- [26] MARDIS, E.R., DING, L., DOOLING, D.J., et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *New England Journal of Medicine*, 2009, vol. 361, no.11, s. 1058-1066. ISSN 1533-4406
- [27] LINK, D.C. Molecular genetics of AML. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 2012, vol. 25, no. 4, s. 409-414. ISSN 1521-6926

- [28] OFRAN, Y., ROWE, J.M. Genetics profiling in acute myeloid leukemia – where are we and what is its role in patients management. *British Journal of Haematology*, 2013, vol. 160, no. 3, s. 303-320. ISSN 1365-2141
- [29] BENNET, J., CATOVSKY, D., DANIEL, M. et al: Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) cooperative group. *British Journal of Haematology*, 1976, vol. 33, no. 4, s. 451-458. ISSN 1365-2141
- [30] VARDIMAN, J.W., HARRIS, N.L., BRUNNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 2002, vol. 100, no. 7, s. 2292-2302. ISSN 1528-0020
- [31] SWERDLOW, S. H. (ed.). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. ISBN 978-92-832-2431-0
- [32] DÖHNER, H., ESTEY, E.H., AMADORI, S., et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2010, vol. 115, no. 3, s. 453-474. ISSN 0006-4971
- [33] FERRARA, F., SCHIFFER, Ch.A. Acute myeloid leukemia in adults. *Lancet*, 2013, vol. 381, no. 9865, s. 484-495. ISSN 0140-6736
- [34] APPELBAUM, F.R., GUNDACHER, H., HEAD, D.R., et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 2006, vol. 107, no. 9, s. 3481-3485. ISSN 1528-0020
- [35] JULIUSSON, G., ANTUNOVIC, P., DEROLF, A., et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 18, s. 4179-4187. ISSN 0006-4971
- [36] ERBA, H.P. Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment. *Hematology, American Society of Hematology Education Program*, 2007, s. 420-428.
- [37] SORROR, M.L., MARIS, M.B., STORB, R., et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT) – specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*, 2005, vol. 106, no. 8, s. 2912-2919. ISSN 0006-4971
- [38] GILES, F.J., BORTHAKUR, G., RAVANDI, F., et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*, 2007, vol. 136, no. 4, s. 624-627. ISSN 1365-2141
- [39] DALLEY, C., D., LISTER, T., A., CAVENAGH, J., D., et al. Serum LDH, a prognostic factor in elderly patients with acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Cancer*, 2001, vol. 84, no. 1, s. 147. ISSN 1532-1827
- [40] MARTIN, G., BARRAGAN, E., BOLUFER, P., et al. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement. *Haematologica*, 2000, vol. 85, no. 7, s. 699-703. ISSN 1592-8721

[41] NGUYEN, S., LEBLANC, T., FENAU, P., et al. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from French AML Intergroup. *Blood*, 2002, vol. 99, no. 10, s. 3517-3523. ISSN 1528-0020

[42] GREENWOOD, M.,J., SEFTEL, M.,D., RICHARDSON, C., et al. Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 2006, vol. 47, no. 7, s. 1245-1252. ISSN 1042-8194

[43] LARSON, R.,A. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 2007, vol. 20, no. 1, s. 29-37. ISSN 1521-6926

[44] GRIMWADE, D., WALKER, H., HARRISON, G., et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial. *Blood*, 2001, vol. 98, no. 5, s. 1312-1320. ISSN 0006-4971

[45] SCHOCH, C., KERN, W., SCHNITTGER, S., et al. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML) an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia*, 2004, vol. 18, no. 1, s.120-125 ISSN 1476-5551

[46] GAJEWSKI, J., L., HO, W., G., NIMER, S.,D., et al. Efficacy of intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia associated with preleukemic syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 1989, vol. 7, no. 11, s. 1637-1645. ISSN 1527-7755

[47] KERN, W., HAFERLACH, T., SCHNITTGER, S., et al. Prognosis in therapy-related acute myeloid leukemia and impact of karyotype. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, vol. 22, no. 12, s. 2510-2511. ISSN 1527-7755

[48] BYRD, J.,C., MROZEK, K., DODGE, R.,K., et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia, results from Cancer and Leukemia Group B (CALBG 8461). *Blood*, 2002, vol. 100, no. 13, s. 4325-4336. ISSN 0006-4971

[49] SLOVAK, M., L., KOPECKY, K., J., CASSILETH, P.,A., et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a South West Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*, 2000, vol. 96, no. 13, s. 4075-4083. ISSN 0006-4971

[50] GRIMWADE, D., HILLS, R., K., MOORMAN, A., V., et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trial. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 3, s. 354-365. ISSN 0006-4971

[51] BREEMS, D., A., VAN PUTTEN, W., L., DE GREEF, G., E., et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than complex karyotype. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 26, no. 29, s. 4791-4793. ISSN 1527-7755

- [52] KAYSER, S., ZUCKNICK, M., DÖHNER, K., et al. Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatments strategies. *Blood*, 2012; vol.119, no.2, s. 551-558. ISSN 1528-0020
- [53] CORNELISSEN, J., J., VAN PUTTEN, W., L., VERDONCK, L., F., et al. Results of a HOVON/SAK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA identical sibling transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adult: benefits for whom. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 9, s. 3658-3666. ISSN 1528-0020
- [54] KORETH, J., SCHLENK, R., KOPECKY, K., J., et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: systematic review and metaanalysis of prospective clinical trials. *JAMA*, 2009, vol. 301, no. 22, s. 2346-2361. ISSN 1538-3598.
- [55] ROSNET, O., SCHIFF, C., BUSQUE, M., J., et al. Human FLT3/FLK2 gene, cDNA cloning and expression in haematopoietic cells. *Blood*, 1993, vol. 82, no. 4, s. 1110-1119. ISSN 1528-0020
- [56] ROSNET, O., BUHRING, H., J., MARCHETTO, S., et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed on the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*, 1996, vol. 10, no. 2, s.238-248 ISSN 1476-5551
- [57] MESHINCHI, S., APPELBAUM, F.,R. Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 2009, vol. 15, no. 13, s. 4263-4269. ISSN 1557-3265
- [58] RUSTEN, L., S., LYMAN, S., D., VEIBY, O., P., et al. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow cells in vitro. *Blood*, 1996; vol. 87, no. 4, s. 3563-3570. ISSN 1528-0020
- [59] NAKAO, M., YOKOTA, S., IWAI, T., et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1996, vol. 10, no. 12, s. 1911-1918. ISSN 1476-5551
- [60] KIYOI, H., TOWATARI, M., YOKOTA, S., et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 1998, vol. 12, no. 9, s. 1333-1337. ISSN 1476-5551
- [61] GALE, R., E., GREEN, C., ALLEN, C., et al. The impact of FLT3 mutation level, number, size and interaction with NPM1 mutations in large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008, vol.111, no. 5, s. 2776-2784. ISSN 1528-0020
- [62] KIYOI, H., NAOE, T., NAKANO, Y., et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 1999, vol. 93, no. 9, s. 3074-3080. ISSN 1528-0020
- [63] KOTTARIDIS, P., D., GALE, R., E., FREW, M., E., et al. The presence of FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic informatik to cytogenetics risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 2001, vol. 98, no.6, s. 1752-1759. ISSN 1528-0020
- [64] MROZEK, K., MARCUCCI, G., NICOLET, D., et al. Prognostic signifkance oif the European LeukemiaNet stndardized systém for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukiemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2012; 30: 4515-4523. ISSN 1527-7755

- [65] PATEL, J., P., GÖNEN, M., FIGUEROA, M., E., et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2012, vol. 366, no. 12, s. 1079-1089. ISSN 1533-4406
- [66] Pekova S, Ivanek R, Dvorak M et al: Molecular variability of FLT3/ITD mutants and their impact on the differentiation program of 32D cells. Implications for the biological properties of AML blasts. *Leukemia Research*, 2009, vol. 33, no. 10, s. 1409-1416. ISSN 0145-2126
- [67] KOTTARIDIS, P.,D., GALE, R.,E., LANGABEER, S., E., et al. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis , minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*, 2002, vol. 100, no.7, s. 2393-2398. ISSN 1528-0020
- [68] GRISENDI, S., MECUCCI, C., FALINI, B., et al. Nucleophosmin and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2006, vol. 6, no. 7, s. 493-505. ISSN 1474-1768
- [69] FALINI, B., MECUCCI, C., TIACCI, E., et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *New England Journal of Medicine*, 2005, vol. 352, no. 3 ,s. 354-266. ISSN 1533-4406
- [70] DEN DUNNEN, J., T., ANTONARAKIS, S., E. Mutation nomenclature extensions and suggestion to describe komplex mutations: a discussion. *Human Mutation*, 2000, vol. 15, no. 1, s. 7-12. ISSN 1098-1004
- [71] BONETTI, P., DAVOLI, T., SIRONI, C., et al. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *Journal of Cell Biology*, 2008, vol. 182, no. 1, s. 19-26. ISSN 1540-8140
- [72] THIEDE, CH., KOCH, S., CREUTZIG, E., et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2006, vol. 107, no. 10, s. 4011-4020. ISSN 1528-0020
- [73] PAZ-PRIEL, I., FRIEDMAN, A. C/EBPalpha Dysregulation in AML and ALL. *Critical Reviews in Oncology*, 2011, vol. 16, no. 1-2, s. 93-102. ISSN 1040-8428
- [74] FRIEDMAN, A., D., MCKNIGHT, S.,L. Identification of two polypeptide segment of CCAAT/enhancer-binding protein required for transcriptional activation of the serum albumin gene. *Genes and Development*, 1990, vol. 4, no.10, s. 1416-1426. ISSN 1549-5477.
- [75] SCOTT, L., M., CIVIN, C., I., RORTH, P., et al. A novel temporal expression pattern of free C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*, 1992, vol. 80, no. 7, s. 1725-1735. ISSN 1528-0020
- [76] GUO, H., FRIEDMAN, A., D. The myeloid expansion in the absence of RUNX1 is associated with increased monoopoiesis, reduced granulopoiesis, and diminished CEBPa gene expression, effects of potential relevance to myeloid transformation. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 21, s. 3147. ISSN 1528-0020
- [77] FRIEDMAN, A.D. Leukemogenesis by CBF oncoproteins. *Leukemia*, 1999, vol. 13, no. 12, s. 1932-1942. ISSN 1476-5551

- [78] RADOMSKA, H.D., BASSERES, D.S., ZHANG, R., et al. Block of C/EBP α function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, vol. 203, no. 2, s. 371-381. ISSN 1540-9538
- [79] PERROTI, D., CESI, V., TROTTA, R., et al. BCR-ABL suppresses C/EBP α expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nature Genetics*, 2002, vol. 30, no. 1, s. 48-58. ISSN 1546-1718
- [80] LIN, L., I., CHEN, C.,Y., LIN, D.T., et al. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clinical Cancer Research*, 2005, vol. 11, no.4, s. 1372-1379. ISSN 1557-3265
- [81] DUFOUR, A., SCHNEIDER, F., METZELER, K.,H., et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct entity associated with favorable clinical outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no. 4, s. 570-577. ISSN 1527-7755
- [82] PABST, T., EYHOLZER, M., FOS, J., et al. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations, only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *British Journal of Cancer*, 2009, vol. 100, no. 8, s. 1343-1346. ISSN 1532-1827
- [83] FROHLING, S., SCHLENK, R., F., STOLZE, I., et al. CEBPA mutations in younger adults patients with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, vol. 22, no. 4, s. 624-635. ISSN 1527-7755
- [84] TASKESEN, E., BULLINGER, L., CORBACIOGLU, A., et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression feature of AML with CEBPA mutations in cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 8, s. 2469-2475. ISSN 1528-0020
- [85] GREEN, C., L., KOO, K., K., HILLS, R., K., et al. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no. 16, s. 2739-2747. ISSN 1527-7755
- [86] RENNEVILLE, A., BOISSEL, N., GACHARD, N., et al. The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal tandem duplication. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 21, s. 5090-5093. ISSN 1528-0020
- [87] DÖHNER, K., TOBIS, K., ULRICH, R., et al. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *Journal of Clinical Oncology*, 2002, vol. 20, no. 15, s. 3254-3261. ISSN 1527-7755
- [88] SCHNITTGER, S., KINKELIN, U., SCHOCH, C., et al. Screening for MLL tandem duplications of the MLL gene in 387 unselected patients with AML identify prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia*, 2000, vol.14, no. 5, s. 796-804. ISSN 1476-5551

- [89] WHITMAN, S., P., LIU, S., VUKOSAVLJEVIC, T., et al. The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular targeted therapy. *Blood*, 2005, vol. 106, no. 1, s. 345-352. ISSN 1528-0020
- [90] GARI, M., GOODERE, A., WILSON, G., et al. c-kit pro oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*, 1999, vol. 105, no. 4, s. 894-900. ISSN 1365-2141
- [91] PASCHKA, P., MARCUCCI, G., RUPPERT, A., S., et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2006, vol. 24, no. 24, s. 3904-3911. ISSN 1527-7755
- [92] CAIROLI, B., BEGHINI, A., GRILLO, G., et al. Prognostic impact of c-kit mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006, vol. 107, no. 9, s. 3463-3468. ISSN 1528-0020
- [93] SCHNITTGER, S., KOHL, T., M., HAFRERLADI, T., et al. KIT-D816 mutations in AML-ETO positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood*, 2006, vol. 107, no. 5, s. 1791-1799. ISSN 1528-0020
- [94] MARDIS, E., R., DING, L., DOOLING, D., J., et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *New England Journal of Medicine*, 2009, vol. 361, no. 11, s. 1058-1066. ISSN 1533-4406
- [95] MARCUCCA, G., MAHARRY, K., WU, Y., Z., et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Study B Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no. 14, s. 2348-2355. ISSN 1527-7755
- [96] CHOU, W., C., LEI, W., C., KO, B., S., et al. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2011, vol. 25, no. 2, s. 246-253. ISSN 1476-5551
- [97] THOL, F., DAMM, F., WAGNER, K., et al. Prognostic impact of IDH2 mutation in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 4, s. 614-616. ISSN 1528-0020
- [98] GARZON, R., LIU, S., FABBRI, M., et al. MicroRNA-296 induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT 3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, 2009; vol. 113, no. 25, s. 6411. ISSN 1528-0020
- [99] LEY T., J., DING, L., WALTER, M., J., et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2010, vol. 363, no. 25, s. 2424-2433. ISSN 1533-4406
- [100] SHEN, Y., ZHU, Y., M., FAN, X., et al. Gene station patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 20, s. 5593-5603. ISSN 1528-0020

[101] HOU, H., A., KUO, Y., Y., LIU, C., Y., et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evaluation and clinical implications. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 2, s. 559-568. ISSN 1528-0020

[102] RIBEIRO, A.F., PRATCORONA, M., ERPELINCH-VERSCHUEREN, C., et al. Mutant DNMT3A. a new marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 24, s. 5824-2831. ISSN 1528-0020

[103] METZELER, K., H., WALKER, A., GEYER, S., et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2012, vol. 26, no. 5, s. 1106-1107. ISSN 1476-5551

[104] CHOU, W., C., CHOU, S., C., LIU, C., Y., et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 14, s. 3803-3810. ISSN 1528-0020

[105] ABDEL-WAHAB, O., LEVINE, R., S. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 18, s. 3563-3572. ISSN 0006-4971

[106] MIWA, H., BERAN, M., SAUNDERS, G., F., et al. Expression of the Wilm's tumour gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia*, 1992, vol. 6, no. 5, s. 405-409. ISSN 1476-5551

[107] OSTERGAARD, M., OLESEN, L., H., HASLE, H., et al. WT1 gene expression. An excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukemia patients – results from a single-centre study. *British Journal of Haematology*, 2004, vol. 125, no. 5, s. 590-600. ISSN 1365-2141

[108] BRIEGER, J., WEIDMANN, E., FENCHEL, K., et al. The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia*, 1994, vol. 8, no. 12, s. 2138-2143. ISSN 1476-5551

[109] CILLONI, D., GOTTARDI, E., DE MICHELI, D., et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*, 2002, vol. 16, no. 10, s. 2115-2121. ISSN 1476-5551

[110] CANDONI, A., TIRIBELLI, M., TOFFOLETTI, E., et al. Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *European Journal Of Haematology*, 2009, 82, no. 1, s. 61-68. ISSN 1600-0609.

[111] SCHMID, D., HEINZ, G., LINNERTH, B., et al. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1997, vol. 11, no. 5, s. 639-643. ISSN 1476-5551

[112] YANG, L., HAN, Y., SUAREZ, S., et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 2007, vol. 21, no. 5, s. 868-876. ISSN 1476-5551

[113] VIRRAPANNE, P., GALE, R., HILLS, R., et al. Mutation of the Wilm's tumor 1 gene is poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia the United Kingdom Medical Council Adult Leukemia Working Party. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 26, no. 33, s. 5429-5435. ISSN 1527-7755

[114] Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS et al: Wilm's tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 26, no. 28, s. 4595-4602. ISSN 1527-7755

[115] GAIDZIK, V., I., SCHLENK, R., F., MOSCHNY, S., et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. A study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 19, s. 4505-4511. ISSN 1528-0020

[116] RENNEVILLE, A., BOISSEL, N., ZURAWSKI, V., et al. Wilms tumor 1 gene mutations are associated with higher risk of recurrence in young adult with acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association. *Cancer*, 2009, vol. 115, no. 16, s. 3719-3727. ISSN 1097-0142

[117] TANNER, S., M., AUSTIN, J.L., LEONE, G., et al. BAALC the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 2001, vol. 98, no. 24, s. 13901-13906. ISSN 1091-6490

[118] LANGER, C., RADMACHER, M., D., RUPPERT, A., S., et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B (CALBG) study. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 11, s. 5371-5379. ISSN 1528-0020

[119] HEUSER, M., BERG, T., KUCHENBAUER, F., et al. Functional role of BAALC in leukemogenesis. *Leukemia*, 2012, vol. 26, no. 3, s. 532-536. ISSN 1476-5551

[120] BALDUS, C., D., TANNER, S., M., RUPPERT, A., S. et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*, 2003, vol. 102, no. 5, s. 1613-1618. ISSN 1528-0020

[121] Damiani D, Tiribelli M, Franzoni A et al: BAALC overexpression retains negative role across all cytogenetic groups in acute myeloid leukemia patients. *American Journal of Hematology*, 2013, vol. 88, no. 10, s. 848-852. ISSN 1096-8652

[122] CARELLA, C., BONTEN, J., SIRMA, S., et al. MN1 over expression is an important step in the development of inv(16) AML. *Leukemia*, 2007, vol. 21, no. 8, s. 1679-1690. ISSN 1476-5551

[123] GOLUB, T., R., SLONIM, D., K., TAMAYO, P., et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999, vol. 286, no. 5439, s. 531-537. ISSN 1095-9203

[124] HEUSER, M., BEUTEL, G., KRANTER, J., et al. High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood*, 2006, vol. 108, no. 12, s. 3898-3905. ISSN 1528-0020

[125] XIANG, L., LI, M., LIU, Y., al. The clinical characteristics and prognostic significance of MN1 gene and MN1-associated micro RNA expression in adults patients with de novo acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*, 2013, vol. 92, no. 8, s. 1063-1069. ISSN 1432-0584

[126] MARCUCCI, G., BALDUS, C., D., RUPPER, A.S., et al. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: A Cancer

and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, vol. 23, no. 36, s.9234-9242. ISSN 1527-7755

[127] OIKAWA, T. ETS transcription factors : possible targets for cancer therapy. *Cancer Science*, 2009, vol. 95, no. 8, s. 626-633. ISSN 1349-7006

[128] MARCUCCI, G., MAHARRY, K., WHITMAN, S.P., et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predicts averse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, vol. 25, no. 22, s. 3337-3343. ISSN 1527-7755

[129] BALDUS, C.,D., LIYANARACHCHI, S., MROZEK, K., et al. Acute myeloid leukemia with komplex karyotypes and abnormal chromosome 21. Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 2004, vol. 101: no. 11, s. 3915-3920. ISSN 1091-6490

[130] BARJESTEHE VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI, S., ERPELINCK, C., VAN PUTTEN, W., L., et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia. A study of 319 de novo AML patients. *Blood*, 2003, vol. 101, no. 3, s. 837-845. ISSN 1528-0020

[131] LUGTHART, S., VAN DRUNEN, E., VAN NORDEN, Y., et al. High EVI1 levels predict averse outcome in acute myeloid leukemia. Prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities is underestimated. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 8, s. 4329-4337. ISSN 1528-0020

[132] HAAS, K., KUNDI, M., SPERR, W., R., et al: Expression and prognostic significance of different mRNA 5'-end variant of the oncogene EVI1 and MDS/EVI1 overexpression both predicts short remission duration. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2008, vol. 47, no. 4, s. 288-298. ISSN 1098-2264

[133] GRÖSCHEL, S., LUGTHART, S., SCHLENK, R., F., et al. High EVI1 Expression Predicts Outcome in Younger Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia and Associated With Distinct Cytogenetic Abnormalities. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no. 12, s. 2101-2107. ISSN 1527-7755

[134] CHESON, B., D., BENNETT, J., M., KOPECKY, K., J., et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2003, vol. 21, no. 3, s.4642-4649. ISSN 1527-7755

[135] WHEATLY, K., BUNNET, A., K., GOLDSTONE, A., H., et al. A simple, robust, validated and highly predictive index for determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukemia derived from MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukemia Working Parties. *British Journal of Haematology*, 1999, vol. 107, no. 1, s. 69-79. ISSN 1365-2141

[136] KERN, W., HAFERLACH, T., SCHOCK, C., et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. *Blood*, 2003, vol. 101, no. 1, s. 67-70. ISSN 1528-0020

- [137] GRIMWADE, D., TALLMAN, M., S. Should minimal residual disease monitoring be the standard of care for all patients with acute promyelocytic leukemia? *Leukemia Research*, 2011, vol. 35, no. 1, s. 3-7. ISSN 1873-5835
- [138] CARLSSON, K., B., GUZMAN, M., L. Is minimal residual disease monitoring clinically relevant in adults with acute myelogenous leukemia? *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2013; vol. 8, no. 2, s. 109-115. ISSN 1558-8211
- [139] CORBACIOGLU, A., SCHOLL, C., SCHLENK, R., F., et al. Prognostic impact of minimal residual disease in CBFβ-MYH11-positive acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no. 23, s. 3724-3729. ISSN 1527-7755
- [140] YIN, J., A., O'BRIEN, M., A., HILLS, R., K., et al: Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of United Kingdom MRC AML 15 trial. *Blood*, 2012; vol. 120, no. 4, s. 2826-2835. ISSN 1528-0020
- [141] YAMAMOTO, Y., KIYOI, H., NAKAMO, Y., et al: Activating mutation of D835 within the activation loop FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 2001, vol. 97, no. 8, s. 2434-2439. ISSN 1528-0020
- [142] CLOOS, J., GOEMANS, B., F., HESS, C., J. et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia*, 2006, vol. 20, no. 7, s. 1217-1220. ISSN 1476-5551
- [143] SCHNITTGER, S., WORMANN, B., HIDDEMANN, W., et al. Partial tandem duplication of the MLL gene are detectable in peripheral blood and bone marrow of nearly all healthy donors. *Blood*, 1998, vol. 92, no. 5, s. 1728-1734. ISSN 1528-0020
- [144] GORELLO, P., CAZZANIGA, G., ALBERTI, F., et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*, 2006, vol. 20, no. 6, s. 1103-1108. ISSN 1476-5551
- [145] Schnittger S, Kern W, Tschulik C et al: Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation specific real-time PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*, 2009, vol. 114, no. 11, s. 2220-2231. ISSN 1528-0020
- [146] KRÖNKE, J., SCHLENK, R., JENSEN, K., O., et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia a study from German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 2011, vol. 29, no.19, s. 2709-2716. ISSN 1527-7755
- [147] SHAYEGI, N., KRAMER, M., BORNHÄUSER, M., et al: The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 1, s. 83-92. ISSN 1528-0020
- [148] CILLONI, D., MESSA, F., ARRUGA, F., et al: Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica*, 2008, vol. 93, no. 6, s. 921-924. ISSN 1592-8721
- [149] CILLONI, D., RENNEVILLE, A., HERMITTE, F., et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk

stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, vol. 27, no. 31, s. 5195-5201. ISSN 1527-7755

[150] NAJIMA, Y., OHASHI, K., KAWAMURA, M., et al. Molecular monitoring of BAALC expression in patients with CD34-positive acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology*, 2010, vol. 91, no.4, s. 636-645. ISSN 1865-3774

[151] OSTERGAARD, M., OLESEN, L., H., HASLE, H., et al. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukemia patients – results from a single-centre study. *British Journal of Haematology*, 2004, vol. 125, no. 5, s. 590-600. ISSN 1365-2141

[152] BUCCISANO, F., MAURILLO, L., PRINCIPE, M., I., et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 2, s. 332-341. ISSN 1528-0020

[153] FREEMAN, S., D., JOVANOVIĆ, J., V., GRIMWADE, D., et al. Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Seminars in Oncology*, 2008, vol. 35, no. 4, s. 388-400. ISSN 1532-8708

[154] OSSENKOPPELE, G., J., VAN DE LOOSDRECHT, A., A., SCHUURHUIS, G., J., et al. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *British Journal of Haematology*, 2011, vol. 153, no. 4, s. 421-436. ISSN 1365-2141

[155] KERN, W., VOSKOVA, D., SCHLENK, C., et al. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute leukemia. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 10, s. 3078-3085. ISSN 1528-0020

[156] AL-MAWALI, A., GILLIS, D., LEWIS, I., et al. The use of receiver operating characteristics analysis for detection of minimal residual disease using five-color multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia identifies patients with high risk of relapse. *Cytometry part B: Clinical Cytometry*, 2009, vol. 76, no. 2, s. 91-101. ISSN: 1552-4957

[157] BUCCISANO, F., MAURILLO, L., GATTEI, V., et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2006, vol. 20, no. 10, s. 1783-1789. ISSN 1476-5551

[158] GERBER, J., M., SMITH, B., D., NGWANG, B., et al. A clinically relevant population of leukemic CD34+CD38- cells in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 15, s. 3571-3577. ISSN 1528-0020

[159] WILL, B., STEIDL, U. Multi-parameter fluorescence-activated cell sorting and analysis of stem and progenitor cells in myeloid malignancies. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 2010, vol. 23, no. 3, s. 391-401. ISSN 1521-6926

[160] YATES, J., W., WALLACE, H., J., ELLISON, R., R., et al. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemotherapy Reports*, 1973, vol. 57, no. 4, s. 485-488. ISSN 0069-0112

[161] ARLIN, Z., CASE, D., C., MOORE, J., et al. Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously untreated adult patients with acute

nonlymphocytic leukemia (ANLL). Lederle Cooperative Group. *Leukemia*, 1990, vol. 4, no. 3, s. 177-183. ISSN 1476-5551

[162] BERMAN, E., HELLER, G., SANTORSA, J., et al. Results of randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood*, 1991, vol. 77, no. 8, s. 1666-1674. ISSN 1528-0020

[163] WIERNIK, P., BANKS, P., L., CASE, D., C., et al. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 1992, vol. 79, no. 2, s. 313-319. ISSN 1528-0020

[164] BISHOP, J.F, LOWENTHAL, R., M., JOSHUA, D. et al. Etoposide in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*, 1990, vol. 75, no. 1, s. 27-32. ISSN 1528-0020

[165] OSSENKOPPELE, G., J., GRAVELAND, W., J., SONNEVELD, P., et al. The value of fludarabine in addition to ARA-C and G-CSF in the treatment of patients with high-risk myelodysplastic syndromes and AML in elderly patients. *Blood*, 2004, vol. 103, no. 8, s. 2908-2913. ISSN 1528-0020

[166] LIST, A., F., KOPECKY, K., J., WILLMAN, C., L., et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*, 2001, vol. 98, no. 12, s. 3212-3220. ISSN 1528-0020

[167] WEICK, J., K., KOPECKY, K., J., APPELBAUM, F., R., et al. A randomised investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology group Study. *Blood*, 1996, vol. 88, no. 8, s. 2841-2851. ISSN 1528-0020

[168] BISHOP, J., F., MATTHEWS, J., P., YOUNG, G., A., et al. Randomised study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood*, 1996, vol. 87, no.5, s. 1710-1717. ISSN 1528-0020

[169] LÖWENBERG, B., VAN PUTTEN, W., THEOBALD, M., et al. Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2003, vol. 349, no. 8, s. 743-752. ISSN 1533-4406

[170] THOMAS, X., RAFFOUX, E., DE BOTTON, S., et al. Effect of priming with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in younger adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a trial by Th Acute leukemia French Association (ALFA) Group. *Leukemia*, 2007, vol. 21, no. 3, s.453-461. ISSN 1476-5551

[171] BÜCHNER, T., BERDEL, W., E., HIDDEMANN, W., et al. Priming with granulocyte colony stimulating factor – relation to high-dose cytarabine in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2004; vol. 350, no. 21, s. 2215-2216. ISSN 1533-4406

[172] HOLOWIECKI, J., GROSICKI, S., GIEBEL, S., et al: Cladribine, but not fludarabine, addend to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: A multicenter, randomised phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, vol. 30, no. 20, s. 2441-2448. ISSN 1527-7755

[173] ROWE, J., M. Consolidation therapy. What should be the standard of care? *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 2008, vol. 21, no. 1, s. 53-60. ISSN 1521-6926

- [174] ELONEN, E., ALMQVIST, A., HÄNNINEN, A., et al. Comparison between four and eight cycles of intensive chemotherapy in adult acute myeloid leukemia: a randomized trial of the Finnish Leukemia Group. *Leukemia*, 1998, vol. 12, no. 7, s. 1041-1048. ISSN 1476-5551
- [175] BURNETT, A., K., GOLDSTONE, A., STEVENS, R., M., F., et al. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensity chemotherapy for acute myeloid leukemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. *Lancet*, 1998, vol. 351, no. 9104, s. 700-708. ISSN 0140-6736
- [176] MOORE, J., O., GEORGE, S., L., DODGE, R., K., et al. Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as post-remission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 9, s. 3420-3427. ISSN 1528-0020
- [177] SCHLENK, R., F., BENNER, A., KRAUTER, J., et al. Individual patient data-based meta-analysis of patient agenda 16-60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, vol. 22, no. 18, s. 3741-3750. ISSN 1527-7755
- [178] DELAUNAY, J., VEY, N., LEBLANC, T., et al. Prognosis of inv(16) t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from French AML Intergroup. *Blood*, 2003, vol. 102, no. 2, s. 462-469. ISSN 1528-0020
- [179] SCHLENK, R., F., PASQUINI, M., C., PÉREZ, W., S., et al. HLA identical sibling allogeneic transplants versus chemotherapy in acute myelogenous leukemia with t(8;21) in first complete remission: collaborative study between the German AML Intergroup and CIBMTR. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2008, vol. 14, no. 2, s. 187-196. ISSN 1523-6538
- [180] SCHLENK, R., F., DÖHNER, K., KRAUTER, J., et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2008, vol. 358, no. 18, s. 1909-1918. ISSN 1533-4406
- [181] MEIJER, E., CORNELISSEN, J., J. Allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia in first or subsequent remission: weighing prognostic markers predicting relapse and risk factors for non-relapse mortality. *Seminars in Oncology*, 2008, vol. 35, no. 4, s. 449-457. ISSN 1532-8708
- [182] BASARA, N., SCHULTZE, A., WEDDING, U., et al. Early related or unrelated hematopoietic cell transplantation results in higher overall survival and leukemia-free survival compared with conventional chemotherapy in high-risk acute myeloid leukemia patients in first complete remission. *Leukemia*, 2009, vol. 23, no. 4, s. 635-640. ISSN 1476-5551
- [183] YAKOUB-AGHA, I., DE LA SALMONIERE, P., RIBAUD, P., et al. Allogeneic bone marrow transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: a long term study of 70 patients – report of the French Society of Bone marrow Transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, vol. 18, no. 5, s. 963-971. ISSN 1527-7755
- [184] NEVILL, T., J., HOGGE, D., E., TOZE, C., L., et al. Predictors of outcome following myeloablative allo-SCT for therapy-related myelodysplastic syndrome and AML. *Bone Marrow Transplantation*, 2008, vol. 42, no. 10, s. 659-666. ISSN 1476-5356
- [185] FUNG, H., C., STEIN, A., SLOVAK, M., L., et al. A long-term follow-up report on allogeneic stem cell transplantation for patients with primary refractory acute myelogenous

leukemia: impact of cytogenetic characteristics on transplantation outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2003, vol. 9, no. 12, s. 766-771. ISSN 1523-6538

[186] SINGHAL, S., POWLES, R., HENSLEE-DOWNEY, P., J., et al. Allogeneic transplantation from HLA matched sibling or partially HLA mismatched related donors for primary refractory acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, 2002, vol. 29, no. 4, s. 291-295. ISSN 1476-5356

[187] SCHMID, CH., SCHLEUNING, M., LEDDERROSE, G., et al. Sequential Regimen Of Chemotherapy, Reduced-Intensity Conditioning for Allogeneic Stem Cell Transplantation, and Prophylactic Donor Lymphocyte Transfusion in High-Risk Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, vol. 23, no. 24, s. 5675-5687. ISSN 1527-7755

[188] CRADDOCK, C., TAUROS, S., MOSS, P., et al. Biology and management of relapsed acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*, 2005, vol. 129, no. 1, s. 18-34. ISSN 1365-2141

[189] BREEMS, D., A., VAN PUTTEN, W., L., J., HUIJGENS, P., C., et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, vol. 23, no. 9, s. 1969-1978. ISSN 1527-7755

[190] GILES, F., O'BRIEN, S., CORTES, J., et al. Outcome of patients with acute myeloid leukemia after second salvage therapy. *Cancer*, 2005, vol.104 , no. 3, s.547-554. ISSN 1097-0142

[191] BREEMS, D., A., LÖWENBERG, B. Acute myeloid leukemia and the position of autologous stem cell transplantation. *Seminars in Hematology*, 2007; vol. 44, no. 4, s. 259-266. ISSN 1532-8686

[192] GORIN, N., C. Autologous stem cell transplantation in acute myelocytic leukemia. *Blood*, 1998, vol. 92: no.4, s. 433-444. ISSN 1528-0020

[193] LÖWENBERG, B., OSSENKOPPELE, G., J., VAN PUTEN, W., et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2009, 361, no.13, s. 1235-1248. ISSN 1533-4406

[194] SEKERES, M., A. Treatment of older adults with acute myeloid leukemia: state of art current perspectives. *Haematologica*, 2008, vol. 93, no.12, s. 1769-1772. ISSN 1592-8721

[195] RÖWE, J.,M., NEUBERG, D., FRIEDENBERG, W., et al. A phase 3 study of three induction regiment and of primic GM-CSF in older adults with acute myeloid leukemia: a trial by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Blood*, 2004, vol. 103, no. 2, s. 479-485. ISSN 1528-0020

[196] SEKERES, M., A., ELSON, P., KALAYCIO, M., E., et al. Time from diagnosis to treatment predicts survival in younger, but not older acute leukemia patients. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 1, s. 28-36. ISSN 1528-0020

[197] GOLDSTONE, A., H., BURNETT, A., K., WHEATLEY, K., et al. Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial. *Blood*, 2001, vol. 98, no. 5, s. 1302-1311. ISSN 1528-0020

- [198] STONE, R., M., BERG, D., T., GEORGE, S., L., et al. Post-remission therapy in older patients with de novo acute myeloid leukemia: a randomized trial comparing mitoxantrone and intermediate-dose cytarabine with standard-dose cytarabine. *Blood*, 2001, vol. 98, no. 3, s. 548-553. ISSN 1528-0020
- [199] Burnett AK, Hills RK, Milligan DW et al: Attempts to Optimize Induction and Consolidation Treatment in Acute Myeloid Leukemia: Results of the MRC AML12 Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no. 4, s. 586-595. ISSN 1527-7755
- [200] GARDIN, C., TURTURE, P., FAGOT, T., et al: Post-remission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after intensive induction chemotherapy: results of the multicenter randomized Acute Leukemia French Association (ALFA) 9803 trial. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 12, s. 5129-5135. ISSN 1528-0020
- [201] SCHLENK, R., F., FRÖHLING, S., HARTMANN, F., et al. Intensive consolidation versus maintenance therapy in patients 61 years or older with acute myeloid leukemia in first remission: results of second randomization of the AML HD 98-B treatment trial. *Leukemia*, 2006, vol. 20, no. 4, s. 748-750. ISSN 1476-5551
- [202] DE LIMA, M., GIRALT, S. Allogeneic transplantation for elderly patients with acute myelogenous leukemia of myelodysplastic syndrome. *Seminars in Hematology*, 2006, vol. 43, no. 2, s. 107-117. ISSN 1532-8686
- [203] ESTEY, E., DE LIMA, M., TIBES, R., et al. Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimen for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*, 2007, vol. 109, no. 4, s. 1395-1400. ISSN 1528-0020
- [204] SHIMONI, A., KRÖGER, N., ZABELINA, T., et al. Hematopoietic stem-cell transplantation from unrelated donors in elderly patients (age > 55 years) with hematologic malignancies: older age is not longer a contraindication when using reduced intensity conditioning. *Leukemia*, 2005, vol. 19, no. 1, s. 7-12. ISSN 1476-5551
- [205] SCHETELIG, J., BORNHÄUSER, M., SCHMID, C., et al. Matched unrelated of matched sibling donors results in comparable survival after allogeneic stem cell transplantation in elderly patients with acute myeloid leukemia: a report from Cooperative German Transplant Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 26, no. 32, s. 5183-5191. ISSN 1527-7755
- [206] Menzin J, Lang K, Earle CC et al: The outcomes and costs of acute myeloid leukemia among elderly. *Archives of Internal Medicine*, 2002, vol. 162, no. 14, s. 1597-1603. ISSN 1538-3679
- [207] WHEATLEY, K., BROOKES, C., L., HOWMAN, A., J., et al. Prognostic factor analysis of the survival of elderly patients with AML in the nMRC AML 11 and LRF AML 14 trials. *British Journal of Haematology*, 2009, vol. 145, no. 5, s. 598-605. ISSN 1365-2141
- [208] BURNETT, A., K., MILLIGAN, D., PRENTICE, A., G., et al: A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*, 2007, vol. 109, no. 6, s. 1114-1124. ISSN 1097-0142
- [209] ZITTOUN R., A., MANDELLI, F., WILLEMZE, R., et al: Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia.

European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GINEMA) Leukemia Cooperative Groups. *New England Journal of Medicine*, 1995, vol. 332, no.4, s. 217-233. ISSN 1533-4046

[210] HAROUSSEAU, J., L., CAHN, J., Y., PIGNON, B., et al. Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aiguës Myeloblastiques (GOELAM). *Blood*, 1997, vol. 90, no.8, s. 2978-2986. ISSN 1528-0020

[211] BREEMS, D., A., BOOGAERTS, M., A., DEKKER, A., W., et al. Autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy in the treatment of adult patients under 60 years with acute myeloid leukemia in first complete remission: a prospective randomized Dutch-Belgian Haemato-Oncology Co-operative Group (HOVON) and Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) trial. *British Journal of Haematology*, 2005, vol. 128, no. 1, s. 59-65. ISSN 1365-2141

[212] CASSILETH, P., A., HARRINGTON, D., P., APPELBAUM, F., R., et al.: Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1998, vol. 339, no. 23, s. 1649-1656. ISSN 1533-4046

[213] SESHADRI, T., KEATING, A. Is There a Role for Autotransplant in AML in First Remission? *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2009, vol. 15, no. 1, s. 17-20. ISSN 1523-6538

[214] TSIMBERIDOU, A., M., STAVROYIANNI, N., VINIOU, N., et al. Comparison of allogeneic stem cell transplantation, high-dose cytarabine, and autologous peripheral stem cell transplantation as postremission treatment in patients with de novo acute myelogenous leukemia. *Cancer*, 2003, vol. 97, no. 7, s. 1721-1731. ISSN 1097-0142

[215] BUCHNER, T., BERDEL, W., E., SCHOCH, C, et al. Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2006, vol. 24: no. 16, s.480-2489. ISSN 1527-7755

[216] SUCIU, S., MANDELLI, F., DE WITTE, T., et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1) an intention-to-treat analysis of the EORTC/GINEMA AML-10 trial. *Blood*, 2003, vol. 102, no. 4, s. 1232-1240. ISSN 1528-0020

[217] KEATING, A., KUKREJA, M., SILVA, G., et al. Similar 5-year survival after peripheral blood autotransplants versus HLA sibling myeloablative transplants for acute myeloid leukemia in first complete remission. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 11, s. 2168. ISSN 1528-0020

[218] CHO, B., S., KIM, J., H., YOON, J., H., et al. Superior transplantation outcome of 8/8-matched unrelated donors as well as matched siblings to autologous transplantation for acute myeloid leukemia with intermediate cytogenetics. *European Journal of Haematology*, 2013, vol. 90, no. 5, s. 365-374. ISSN 1600-0609

[219] GUIÉZE, R., CORNILLET-LEFEBVRE, P., LIOURE, B., et al. Role of autologous hematopoietic stem cell transplantation according to the NPM1/FLT3-ITD molecular status for

cytogenetically normal AML patients: a GOELAMS study. *American Journal of Hematology*, 2012, vol. 87, no. 12, s. 1052-1056. ISSN 1096-8652

[220] SABTY, F., A., DEMECKOVA, E., BOJTAROVA, E., et al. Is there still a role for autologous stem cell transplantation in acute myeloid leukemia? *Neoplasma*, 2013, vol. 60, no.2, s. 167-173. ISSN 1338-4317

[221] VELLENGA, E., VAN PUTTEN, W., OSSENKOPPELE, G., J., et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 23, s. 6037-6042. ISSN 1528-0020

[222] FORAN, J., M., PAVLETIC, S., Z., LOGAN, B., R., et al. Unrelated donor allogeneic transplantation after failure of autologous transplantation for acute myelogenous leukemia: a study from the center for international blood and marrow transplantation research. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2013, vol. 19, no. 13, s. 1102-1108. ISSN 1523-6538

[223] OSSENKOPPELE, G., J., JANSENN, J., J., HUIJGENS, P., C. Autologous Stem Cell Transplantation in elderly Acute Myeloid Leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 2013, vol. 5, no. 1, e2013018.

[224] THOMAS, X., SUCIU, S., RIO, B., et al. Autologous stem cell transplantation after complete remission and first consolidation in acute myeloid leukemia patients aged 61-70 years: results of the prospective EORTC-GINEMA AML-13 study. *Haematologica*, 2007, vol. 92, no. 3, s. 389-396. ISSN 1592-8721

[225] FERRARA, F., PALMIERI, S., PEDATA, M., et al. Autologous stem cell transplantation for elderly patients with acute myeloid leukemia conditioned with continuous infusion idarubicin and busulfan. *Hematological Oncology*, 2009, vol. 27, no. 1, s. 40-45. ISSN 1099-1069

[226] PAQUINI, M., C., Wang, Z. Current uses and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation 2012. Summary slides. CIBMTR 2012. <http://cibmtr.org/referencecenter/slidereports/summaryslides/pages/index.aspx>. (přístup listopad 2013)

[227] GOOLEY, T., A., CHIEN, J., W., PERGAM, S., A., et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-stem cell transplantation. *New England Journal of Medicine*, 2010, vol. 363, no. 22, s. 2091-2101. ISSN 1533-4046

[228] BARNES, D., H., W., LOUTIT, J., F. Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow. *British Journal of Haematology*, 1957, vol. 3, no. 3, s. 241-252. ISSN 1365-2141

[229] THOMAS, E., D., STORB, R., CLIFT, R., A., et al. Bone marrow transplantation. *New England Journal of Medicine*, 1975, vol. 292, no. 16, s. 832-843. ISSN 1533-4046

[230] THOMAS, E., D., BUCKNER, C., D., BANAJI, M., et al. One hundred patients with acute myeloid leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation and allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 1977, vol. 49, no. 4, s. 511-533. ISSN 1528-0020

[231] APPELBAUM, F., R., DAHLBERG, S., THOMAS, E., D., et al. Bone marrow transplantation or chemotherapy after remission induction for adults with acute nonlymphoblastic leukemia. a prospective comparison. *Annals of Internal Medicine*, 1984, vol.101, no. 5, s. 581-588. ISSN 1539-3704

- [232] BURNETT, A., K., WHEATLEY, K., GOLDSTONE, A., H., et al. The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC 10 trial. *British Journal of Haematology*, 2002, vol. 118, no. 2, s. 385-400. ISSN 1365-2141
- [233] CORNELISSEN, J., J., BREEMS, D., VAN PUTTEN, W., L., et al. Comparative analysis of the value of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in acute myeloid leukemia with monosomal karyotype versus other cytogenetics risk categories. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, vol. 30, no. 17, s. 2140-2146. ISSN 1527-7755
- [234] MOHR, B., SCHETELIG, J., SCHAFER-ECKART, K., et al. Impact of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with Abel (17p) acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*, 2013, vol. 161, no. 2, s. 237-244. ISSN 1365-2141
- [235] MIDDEKE, M., BEELEN, D., STADLER, M., et al. Outcome of high-risk acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation: negative impact of Abel (17p) and -5/5q. *Blood*, 2012, vol. 120, no. 12, s. 2521-2528. ISSN 1528-0020
- [236] DUVAL, M., KLEIN, J., P., HE, W., et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no. 23, s. 3730-3738. ISSN 1527-7755
- [237] BURNETT, A., K., GOLDSTONE, A., HILLS, W., et al. Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. *Journal of Clinical Oncology*, 2013, vol. 31, no. 10, s. 1293-1301. ISSN 1527-7755
- [238] BROWN, R., A., WOLFF, S., N., FAY, J., W., et al. High-dose etoposide, cyclophosphamide, and total body irradiation with allogeneic bone marrow transplantation for patients with acute myeloid leukemia in untreated first relapse: a study by the North America Marrow transplant Group. *Blood*, 1995, vol. 85, no. 5, s. 1391-1395. ISSN 1528-0020
- [239] CLIFT, R., A., BUCHNER, C., D., APPELBAUM, F., R., et al. Allogeneic marrow transplantation during untreated first relapse of acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 1992; vol. 10, no. 11, s. 1723-1729. ISSN 1527-7755
- [240] SONG, K., W., LIPTON, J. Is it appropriate to offer allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to patients with primary refractory acute myeloid leukemia? *Bone Marrow Transplantation*, 2005, vol. 36, no. 3, s. 183-191. ISSN 1476-5365
- [241] SCHMID, C., LABOPIN, M., NAGLER, A., et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 6, s. 1599-1606. ISSN 1528-0020
- [242] HAMILTON, B., K., COPELAN, E., A. Concise Review: The Role of Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cell*, 2012, vol. 30, no. 8, s. 3581-3586. ISSN 1549-4918
- [243] POWLES, R. 50-years of allogeneic bone-marrow transplantation. *Lancet Oncology*, 2010, vol. 11, no. 4, s. 305-306. ISSN 1474-5488

[244] CHEUK, D. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World Journal of Transplantation*, 2013, vol. 3, no. 4, s. 99-112. ISSN 2220-3230

[245] STEM CELL TRIALIST COLLABORATIVE GROUP. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient meta-analysis of nine randomized trials. *Journal Clinical of Oncology*, 2005, vol. 23, no. 22, s. 5074-5087. ISSN 1527-7755

[246] CHANG, Y., J., WENG, C., L., SUN, L., X., et al. Allogeneic bone marrow transplantation compared to peripheral blood stem cell transplantation for the treatment of hematologic malignancies: a meta-analysis based on time-to-event data from randomized controlled trials. *Annals of Hematology*, 2012, vol. 91, no. 3, s. 427-437. ISSN 1432-0584

[247] ANASETTI, C., LOGAN, B., R., LEE, S., J., et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *New England Journal of Medicine*, 2012, vol. 367, no. 16, s. 1487-1496. ISSN 1533-4046

[248] KANATE, A., S., PASQUINI, M., C., HAN, P., N., et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia: Current state in 2013 and future directions. *World Journal of Stem Cells*, 2014, vol. 6, no. 2, s. 69-81. ISSN 1948-0210

[249] GUPTA, V., TALLMAN, M., S., HE, W., et al. Comparable survival after HLA-well-matched unrelated or matched sibling donor transplantation for acute myeloid leukemia in first remission with unfavorable cytogenetics at diagnosis. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 11, s. 1839-1848. ISSN 1528-0020

[250] IMAHASHI, N., SUZUKI, R., FUKUDA, T. et al: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for intermediate cytogenetic risk AML in first CR. *Bone Marrow Transplantation*, 2013; vol. 48, no. 1, s. 56-62. ISSN 1476-5365

[251] SABER, W., OPIE, S., RIZZO, J., D., et al. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic stem cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 17, s. 3908-3916. ISSN 1528-0020

[252] LAUGHLIN, M., J., EAPEN, M., RUBINSTEIN, P., et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2004, vol. 351, no. 22, s. 2265-2275. ISSN 1533-4046

[253] WANG, J., ZHAN, P., OUYANG, J., et al. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients: A meta-analysis. *Leukemia Research*, 2010, vol. 34, no. 8, s. 1018-1022. ISSN 1873-5835

[254] ATSUTA, Y., SUZUKI, R., NAGAMURA-INOUE, T., et al. Disease-specific analysis of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 8, s. 1631-1638. ISSN 1528-0020

[255] ROCHA, V., LABOPIN, M., SANZ, G., et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *New England Journal of Medicine*, 2004, vol. 351, no. 22, s. 2276-2285. ISSN 1533-4046

[256] EAPEN, M., ROCHA, V., SANZ, G., et al. Effect of graft source on unrelated donor haematopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncology*, 2010, vol. 11, no. 7, s. 653-660. ISSN 1474-5488

[257] BRUNSTEIN, C., G., BARKER, J., N., WEISDORF, D., J., et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood*, 2007, vol. 110, no. 8, s. 3064-3070. ISSN 1528-0020

[258] BRUNSTEIN, C., G., GUTMAN, J., A., WEISDORF, D., J., et al: Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 22, s. 4693-4699. ISSN 1528-0020

[259] PONCE, D., M., ZHENG, J., GONZALES, A., M., et al. Reduced late mortality risk contributes to similar survival after double-unit cord blood transplantation compared with related and unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2011, vol. 17, no. 9, s. 1316-1326. ISSN 1523-6538

[260] MALARD, F., FÜRST, S., LOIRAT, M., et al. Effect of graft source on mismatched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation after reduced intensity conditioning. *Leukemia*, 2013, vol. 27, no. 11, s. 2113-2117. ISSN 1476-5551

[261] AVERSA, F., TABILIO, A., VELARDI, A., et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cell from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *New England Journal of Medicine*, 1998, vol. 339, no. 17, s. 1186-1193. ISSN 1533-4046

[262] AVERSA, F., TERENCE, A., TABILIO, A., et al. Full holotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high-risk of relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, vol. 23, no.15, s. 3447-3454. ISSN 1527-7755

[263] LANG, P., SCHUMM, M., GREIL, J., et al. A comparison between free graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of pilot study. *Klinische Pädiatrie*, 2005, vol. 217, no. 6, s. 334-338. ISSN 1439-3824

[264] FEDERMANN, B., BORNHAUSER, M., MEISNER, C., et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica*, 2012, vol. 97, no. 10, s. 1523-1531. ISSN 1592-8721

[265] LUZNIK, L., O'DONELL, P., V., SYMONS, H., J., et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose posttransplantation cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2008, vol. 14, no. 6, s. 641-650. ISSN 1523-6538

[266] MUNCHEL, A., T., KASAMON, Y., L., FUCHS, E., J. Treatment of hematological malignancies with nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation and high-dose post-transplantation cyclophosphamide. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 2011, vol. 24, no. 3, s. 359-368. ISSN 1532-1924

[267] SOLOMON, S., R., SIZEMORE, C., A., SANACORE, M., et al. Haploidentical transplantation using T-cell replete peripheral blood stem cells and myeloablative conditioning in patients with high-risk hematologic malignancies who lack conventional donor is well tolerated and produced excellent relapse-free survival: results of a prospective phase II trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2012, vol. 18, no. 12, s. 1859-1866. ISSN 1523-6538

- [268] CIUREA, S., O., MULANOVICH, V., SALIBA, R., M., et al. Improved early outcomes using a T cell replete graft compared with T cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2012, vol. 18, no. 12, s. 1835-1844. ISSN 1523-6538
- [269] BASHEY, A., ZHANG, X., SIZEMORE, C., A., et al. T-cell replete HLA-haploidentical hematopoietic transplantation for hematologic malignancies using post-transplantation cyclophosphamide results in outcomes equivalent to those of contemporaneous HLA-matched related and unrelated donor transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 2013, vol. 31: no. 10, s. 1310-1316. ISSN 1527-7755
- [270] BRUNSTEIN, C., G., FUCHS, E., J., CARTER, S., L., et al. Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 2, s. 282-288. ISSN 1528-0020
- [271] HUANG, X., J., ZHU, H., H., CHANG, Y., J., et al. The superiority of haploidentical related stem cell transplantation over chemotherapy alone as postremission treatment for patients with intermediate or high-risk acute myeloid leukemia in first complete remission. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 23, s. 5584-5590. ISSN 1528-002
- [272] GYURKOCZA, B., SANDMAIER, B., M. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014, vol. 124, no. 3, s. 5584-5590. ISSN 1528-0020
- [273] GIRALT, S., BALLEEN, K., RIZZO, D., et al. Reduced-intensity regimen workshop : defining the dose spektrum. Report of a workshop convened by the center for international blood and marrow transplant research. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2009, vol. 15, no. 3, s. 367-369. ISSN 1523-6538
- [274] RINGDEN, O., REMBERGER, M., RUUTU, T., et al. Increased risk of chronic graft-versus-host disease, obstructive bronchiolitis, and alopecia with busulfan versus total body irradiation long-term results of randomized trial in allogeneic marrow recipients with leukemia. Nordic Bone Marrow Transplantation Group. *Blood*, 1999, vol. 93, no. 7, s. 2196-2201. ISSN 1528-0020
- [275] BLAISE, D., MARANINCHI, D., ARCHIMBAUD, E., et al. Allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of busulfan-Cytosan versus Cytosan-total body irradiation as preparative regimen: a report from Group d'Etudes de la Greffe de Moell Osseuse. *Blood*, 1992, vol. 79, no. 10, s. 2578-2582. ISSN 1528-0020
- [276] COPELAN, E., A, HAMILTON, B., K., AVALOS, B., et al. Better leukemia-free survival in AML in first remission following cyclophosphamide in combination with busulfan compared with TBI. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 24, s. 3863-3870. ISSN 1528-0020
- [277] BREDESON, C., LA RADEMACHER, J., KATO, K., et al. Prospective cohort study comparing intravenous busulfan to total body irradiation in hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 24, s. 3871-3878. ISSN 1528-0020
- [278] BORNHÄUSER, M., STORER, B., SLATTERY, J., T., et al. Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. *Blood*, 2003, vol. 102, no. 3, s. 820-826. ISSN 1528-0020

- [279] IRAVANI, M., EVAZI, M., R., MOUSAVI, S., A. et al. Fludarabine and busulfan as a myeloablative conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in high- and standard-risk leukemic patients. *Bone Marrow Transplantation*, 2007, vol. 40, no. 2, s.105-110. ISSN 1476-5365
- [280] LEE, J., H., JOO, Y., D., KIM, H., et al. Randomized trial of myeloablative conditioning regimens: busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine. *Journal of clinical Oncology*, 2013, vol 31, no. 6, s. 701-709. ISSN 1527-7755
- [281] VEY, N., DE PRIJCK, B., FAUCHER, C., et al. A pilot study of busulfan and melphalan as conditioning regimen prior to allogeneic bone marrow transplantation in refractory or relapsed hematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation*, 1996, vol. 18, no. 3, s. 495-499. ISSN 1476-5365
- [282] Nemecek ER, Guthrie KA, Sorrow ML et al: Conditioning with treosulfan and fludarabine followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk hematologic malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2011, vol. 17, no. 3, s. 341-350. ISSN 1523-6538
- [283] ALYEA, E., P., KIM, H.,T., HO, V., et al. Comparative outcome of nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 4, s. 1810-1814. ISSN 1528-0020
- [284] DE LIMA, ANAGNOSTOPOULOS, A., MUNSELL, M., et al. Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 3, s. 865-872. ISSN 1528-0020
- [285] MARTINO, R., DE WREEDE, L., FIOCCO, M., et al. Comparison of conditioning regimens of various intensities for allogeneic hematopoietic SCT using HLA-identical siblings donors in AML and MDS with < 10% BM blasts: a report from EBMT. *Bone Marrow Transplantation*, 2013, vol. 48, no. 6, s. 761-770. ISSN 1476-5365
- [286] AOUDJHANE, M., LABOPIN, M., GORIN, N., C., et al. Comparable outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukemia a retrospective study from Acute Leukemia Working Party (ALWP) of European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia*, 2015, vol. 19, no. 12, s. 2304-2312. ISSN 1476-5551
- [287] HAMADANI, M., CRAIG, M., AWAN, F., T., et al. How we approach patient evaluation for hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2010, vol. 45, no. 8, s. 1259-1268. ISSN 1476-5365
- [288] HAMADANI, M., MOHTI, M., KHARFAN-DABAJA, M., A. Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia. *Cancer Control*, 2011, vol. 18, no. 4, s. 237-245. ISSN 1526-2359
- [289] GRATWOHL, A., STERN, M., BRAND, R., et al. Risk Score for Outcome After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Cancer*, 2009, vol. 115, no. 20, s. 4715-4726. ISSN 1097-0142
- [290] GRATWOHL, A. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplantation*, 2012, vol. 47, no. 6, s.749-756. ISSN 1476-5365

- [291] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO handbook for reporting results of cancer treatment*. Geneva: World Health Organization, 1979. ISBN 92-4-1700433
- [292] KARNOFSKY, D., A., BURCHEN, J., H. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: Macleod CM. *Evaluation of Chemotherapeutic Agents*. New York: Columbia University Press, 1949, s 191.
- [293] SORROR, M., STORER, B., SANDMAIER, B., M., et al. Hematopoietic cell transplantation comorbidity index and Karnofsky performance status are independent predictors of morbidity and mortality after allogeneic nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. *Cancer*, 2008; vol. 112, no., 9, s. 1992-2001. ISSN 1097-0142
- [294] ARTZ, A., S., POLLYEA, D., A., KOCHERGINSKY, M., et al.: Performance status and comorbidity index predict transplant-related mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2006, vol. 12, no. 9, s. 954-964. ISSN 1523-6538
- [295] GUILFOYLE, R., DEMERS, A., BREDESEN, C., et al. Performance status, but not the hematopoietic cell transplantation comorbidity index (HCT-CI), predicts mortality at Canadian transplant center. *Bone Marrow Transplantation*, 2009, vol. 43, no. 2, s. 133-139. ISSN 1476-5365
- [296] VERSLUIS, J., LABOPIN, M., NIEDERWIESER, D., et al. Prediction of non-relapse mortality in recipients of reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation with AML in first complete remission. *Leukemia*, 2015, vol. 29, no. 1, s.51-57. ISSN 1476-5551
- [297] SCHOOF, T., MÜLLER-TIDOW, C. DNA methylation as a pathogenetic event and as therapeutic target in AML. *Cancer Treatment Reviews*, 2011, vol 37, no. 1, s: 13-18. ISSN 1532-1967
- [298] MALIK, P., CASHEN, A., F. Decitabine in the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. *Cancer Management and Research*, 2014, vol. 6, no. 3, s. 53-61. ISSN 1179-1322
- [299] KANTERJIAN, H., M., THOMAS, X., G., DINOSZYNSKA, A., et al. Multicenter, randomized, open-label phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, vol. 30, no. 21, s. 2670-2677. ISSN 1527-7755
- [300] AL-ALI, H., K., JACKEL, N., NIEDERWIESER, D. The role of hypomethylating agents in the treatment of elderly patients with AML. *Journal of Geriatric Oncology*, 2014, vol. 5, no. 1, s. 89-105. ISSN 1879-4076
- [301] FENAUX, P., MUFTI, G., J., HELLSTROM-LINDBERG, E., et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimen in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, vol. 28, no 4, s. 562-569. ISSN 1527-7755
- [302] TETTAMANTI, S., MAGNANI, C., F., BIONDI, A., et al: Acute myeloid leukemia and novel biological treatments: Monoclonal antibodies and cell-based gene-modified immune effectors. *Immunology Letters*, 2013; vol. 15, no 1., s. 43-46. ISSN 1879-0542

- [303] BURNETT, A., K., HILLS, R., K., MILLIGAN, D., et al. Identification of patients with acute myeloid leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRS AML 15 trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2011, vol. 29, no. 4, s. 369-377. ISSN 1527-7755
- [304] DELAUNAY, J., RECHER, C., PIGNEAUX, A., et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to chemotherapy improves event-free survival but not overall survival of AML patients with intermediate cytogenetics not eligible for allogeneic transplantation. Results of the GOELAMS AML 20061R Study. *Blood*, 2011, vol 118, no. 1, s 79. ISSN 1528-0020
- [305] BRUNNBERG, U., MOHR, M., NOPPENNEY, R., et al. Induction therapy of AML with ara-C plus daunorubicin versus ara-C plus gemtuzumab ozogamicin: a randomized phase II trial in the lderly patients. *Annals of Oncology*, 2012, vol 23, no. 4, s. 990-996. ISSN 1569-8041
- [306] Castaigne S, Pautas C, Terre C et al: Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adults patients with de-novo acute myeloid leukemia (ALFA-0701): a rndomized , open-label, phase 3 study. *Lancet*, 2012, vol. 379, no. 9825, s. 1508-1516. ISSN 0140-6736
- [307] BURNETT, A., K., RUSSEL, N., H., HILLS, R., K., et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, vol. 30, no. 32, s. 3924-3931. ISSN 1527-7755
- [308] PETERSDORF, S., H., KOPECKY, K., J., SLOVAK, M., et al. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and post-consolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 24, s. 4854-4860. ISSN 1528-0020
- [309] KHARFAN-DABAHA, M., HAMADANI, M., RELJIC, T., et al. Gemtuzumab ozogamicin for treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia: a systemic review and meta-analysis. *British Journal of Haematology*, 2013, vol. 163, no. 3, s. 315-325. ISSN 1365-2141
- [310] AIGNER, M., FEULNER, J., SCHAFFER, S., et al. T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysi sof AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antipody construct. *Leukemia*, 2013, vol. 27, no. 5, s. 1107- 1115. ISSN 1476-5551
- [311] PEINERT, S., PRINCE, H., M., GURU, P., M., et al. Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. *Gene Therapy*, 2010, vol. 17, no. 5, s 678-686. ISSN 1476-5462
- [312] LYSÁK, D. Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů. *Onkologie*, 2015, vol. 9, no. 1, s. 13-18. ISSN 1802-4475
- [313] HORAN, J., T., LOGAN, B., R., AGOVI-JOHNSON, M., A., et al. Reducing risk for transplantation related mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation: how much progress has been made? *Journal of Clinical Oncology*, 2011, vol. 29, no. 7, s. 805-813. ISSN 1527-7755
- [314] ROWE, J., M. Important milestones in acute leukemia in 2013. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, 2013, vol. 26, no. 3, s. 241-244. ISSN 1532-1924
- [315] GRUBOVIJK, R., M., ALAVI, A., TERRITO, M., et al: Minimal Residual Disease as a Predictive Factor for Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant in Adult

Patients with Acute Myeloid Leukemia in First and Second Complete Remission. *Cancers*, 2012, vol. 4, no.2, s. 601-617. ISSN 2072-6694

[316] VALKOVA, V., POLAK, V., MARKOVA, M., et al. Minimal residual disease detectable by quantitative assessment of WT gene before allogeneic stem cell transplantation in patients in first remission of acute myeloid leukemia has an impact on their future prognosis. *Clinical Transplantation*, 2012, vol. 27, no. 1, s. 21-29. ISSN 1399-0012

[317] WALTER, R., B., BUCKLEY, S., A., PAGEL, J., M., et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 10, s. 1813-1821. ISSN 1528-0020

[318] WALTER, R., B., GYURKOCZA, B., STORB, B., E., et al. Comparison of minimal residual disease as outcome predictor for AML patients in first complete remission undergoing myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia*, 2015, vol. 29, no. 1, s. 137-144. ISSN 1476-5551

[319] BASTOS-OREIRO, M., PEREZ-CORRAL, A., MARTINEZ-LAPARCHE, C., et al. Prognostic impact of minimal residual disease analysis by flow cytometry in patients with acute myeloid leukemia before and after allogeneic stem cell transplantation. *European Journal of Haematology*, 2014, vol. 93, no. 3, s. 239-246. ISSN 1600-0609

[320] ANTHIAS, C., DIGNAN, F., L., MORILLA, R., et al. Pre-transplant MRD predicts outcome following reduced-intensity and myeloablative allogeneic hematopoietic SCT in AML. *Bone Marrow Transplantation*, 2014, vol. 49, no. 5, s. 679-683. ISSN 1476-5365

[321] TIAN, H., CHEN, G., H., XU, Y., et al. Impact of pre-transplant disease burden on the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in refractory and relapsed acute myeloid leukemia: a single center study. *Leukemia and Lymphoma*, 2015, vol. 56, no. 5, s.1353-1361. ISSN 1029-2403

[322] PRZEPIORKA, D., WEISDORF, D., MARTIN, P., et al: 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplantation*, 1995; vol. 15, no. 6, s. 825-828. ISSN 1476-5365

[323] FILIPOVICH, A., H., WEISDORF, D., PAVLETIC, S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005, vol. 11, no. 12, s. 945-956. ISSN 1523-6538

[324] Kristensen T, Möller MB, Friis L et al: NPM1 mutation is a stable marker for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukaemia patients with increased sensitivity compared to WT expression. *European Journal of Haematology*, 2011; vol. 87, no. 5, s. 400-408. ISSN 1600-0609

[325] BACHER, U., BADBARAN, A., FEHSE, B., et al. Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, 2009, vol. 37, no. 1, s. 135-142. ISSN 1873-2399

[326] OELSCHLÄGEL, U., NOWAK, R., SCHAUB, A., et al. Shift of aberrant antigen expression at relapse or at treatment silure in acute leukemia. *Cytometry*, 2000, vol. 42, no. 4, s. 247-253. ISSN 1552-4930

[327] DVORAKOVA, D., RACIL, Z., JEZISKOVA, I., et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with frequent and rare patient-specific NPM1 mutations. *American Journal of Hematology*, 2010, vol. 85, no. 12, s. 926-929. ISSN 1096-8652

[328] OTTONE, T., ZAZA, S., DIVONA, M., et al. Identification of emerging FLT3 ITD-positive clones during clinical remission and kinetics of disease relapse in acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin. *British Journal of Haematology*, 2013, vol. 161, no.4, s. 533-540. ISSN 1365-2141

[329] APPELBAUM, F.R. Measurement of minimal residual disease before and after myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Best Practice and Research Clinical Haematology*, vol. 26, no. 3, s. 279-284. ISSN 1532-1924

[330] USTUN, C., WISEMAN, A., C., DEFOR, T., E., et al. Achieving stringent CR is essential before reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. *Bone Marrow Transplantation*, 2013, vol. 48, no. 11, s. 1415-1420. ISSN 1476-5365

[331] USTUN, C., COURVILLE, E., L., DEFOR, T., E., et al. Myeloablative, but not Reduced-Intensity Conditioning Overcomes the Negative Effect of Flow-Cytometry Evidence of Leukemia in Acute Leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2016, vol.22, no.4, s.669-675. ISSN 1523-6538

[332] SHAYEGI, N., KRAMER, M., BORNHÄUSER, M., et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 1, s. 83-92. ISSN 1528-0020

[333] IVEY, A., HILL, R., K., SIMPSON, M., A., et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *New England Journal of Medicine*, 2016; vol. 374, no. 5, s.422-433. ISSN 1533-4406

[334] BAZARBACHI, A., LABOPIN, M., KHARFAN-DAJABA, M., A., et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia with normal karyotype and isolated Nucleophosmin-1 (NPM1) mutation: outcome strongly correlates with disease status. *Haematologica*, 2015, vol. 101, no. 1, s. 34-37. ISSN 1592-8721

[335] BUCCASINO, F., MAURILLO, L., GATTEI, V., et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2006, vol. 20, no. 10, s.1783-1789. ISSN 1476-5551

[336] MAURILLO, L., BUCCASINO, F., DEL PRINCIPE, M., I., et al. Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 26, no. 30, s. 4944-4951. ISSN 1527-7755

[337] RETRINGER, E., WILLASH, A., M., KREYENBERG, H., et al. Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 20, s. 5681-5688. ISSN 1528-0020

[338] YAN, CH., LIU, D., H., LIN, K., Y., et al. Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute myeloid leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 14, s. 3256-3262. ISSN 1528-0020

[339] PLATZBECKER, U., WERMKE, M., RADKE, J., et al. Azacytidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*, 2012, vol. 26, no.3, s. 381-389. ISSN 1476-5551

[340] SCHROEDER, T., RACKLIS, T., BUG, G., et al. Treatment of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome relapse after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine and donor lymphocyte infusion – a retrospective multicenter analysis from German Cooperative Transplants Study Group. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2015, vol. 21, no. 4, s. 653-660. ISSN 1523-6538

[341] PUSIC, I., CHOI, J., FIALA, M., A., et al. Maintenance therapy with decitabine after allogeneic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplantation*, 2015, vol. 21, no. 10, s. 1761-1769. ISSN 1476-5365

9. Přehled publikovaných prací autora souvisejících s tématem dizertace

9.1 Publikace

CETKOVSKÝ, P., KOUBA, M. et al.
Diferenciální diagnostika plicních infiltrátů.
 Praha: Triton 2009. ISBN 978-80-7387-343-1

CETKOVSKÝ, P., SCHÜTZOVÁ, M., JINDRA, P., ŠKOPEK, P., PITTROVÁ, H., VOZOBULOVÁ, V., ŠVOJGROVÁ, M., NAVRÁTILOVÁ, J., LYSÁK, D., VOKURKA, S., FIŠER, J., ČERNÁ, K., **KARAS, M.**, KOZA, V.

Mobilizace kmenových buněk krvetvorby u nemocných se zhoubnými nádory varlat před plánovanou léčbou vysokými dávkami chemoterapie.

Klinická onkologie, 1999, vol.12, no. 3, s. 97-100. ISSN 1802-5307

LYSAK, D., KOZA, V., JINDRA, P., VOZOBULOVÁ, V., SCHÜTZOVÁ, M., FISER, J., **KARAS, M.**, SVOJGROVÁ, M., VOKURKA, S..

Allogeneic BMT in patients above 45 years of age: a single centre experience.
Bone Marrow Transplantation, 2001, vol. 27, no7, s. 723-726. ISSN 0268-3369. IF 1,9

KARAS, M., ČERNÁ, K., KOZA, V., JINDRA, P., VOZOBULOVÁ, V., SCHÜTZOVÁ, M.

Alogenní transplantace kostní dřeně u pacientů s chronickou myeloidní leukemií v období 1991-1995 a 1996-1998. Zkušenosti Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň.

Vnitřní lékařství, 2001, vol. 47, Suppl.1, s. 34-39. ISSN 1801-7592

JINDRA, P., KOZA, V., **KARAS, M.**, NAVRÁTILOVÁ, J., PITTROVÁ, H., KUSOVÁ, J.

HLA-Cw shoda příjemce a dárce u molekulárně A,B,DR,DQ shodných nepřibuzných dárců kostní dřeně .

Transfuze a hematologie dnes, 2001, vol. 7, no. 4, s. 139-142. ISSN 1213-5763

CETKOVSKÁ, P., PIZINGER, K., **KARAS, M.**

Kožní aspergilóza u pacienta po alogenní transplantaci kmenových buněk krvetvorby.

Česko-slovenská Dermatologie, 2002, vol. 77, no. 5, s. 213-216. ISSN 0009-0514

ROŽMAN, P., **KARAS, M.**, KOŠIR, A., LABAR, B., MADRIGAL, A., MIDDLETON, D., NAVARRETE, C., OUDHOORN, M., SCHENNACH, H., VÍTEK, A., BOHINJEC, M.

Are human platelet alloantigens (HPA) minor transplantation antigens in clinical bone marrow transplantation ?

Bone Marrow Transplantation, 2003, vol. 31, no. 6, s. 481-486. ISSN 0268-3369. IF 1,9

JINDRA, P., KOZA, V., BOUDOVÁ, L., VOZOBULOVA, V., CERNA, K., **KARAS, M.**, LYSÁK, D., SVOJGROVA, M.

Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder in CLL patients after treatment with fludarabine and cyclophosphamide followed by high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation.

Bone Marrow Transplantation, 2003, vol. 31, no. 10, s. 951-952. ISSN 0268-3369. IF 1,9

MÍRKA, H., FERDA, J., **KARAS, M.**, MUKENŠNÁBL, P.

Význam ultrasonografie v diagnostice zánětlivých střevních komplikací hematoonkologických nemocných

Česká radiologie, 2005, vol. 59, no. 4, s. 200-205. ISSN 1210-7883

BRDIČKA, R., BERÁNEK, M., CIMBUROVÁ, M., DVOŘÁČKOVÁ, J., DVOŘÁKOVÁ, D., HÁJKOVÁ, J. HAŠKOVEC, C., KEBRDLOVÁ, V., **KARAS, M.**, KRATOCHVÍLOVÁ, A., LOŠAN, F., MACEK, M., MUSIL, F., PUTZOVÁ, M., ROŽMANOVÁ, S., RIEDLOVÁ, P., ŠAFROVÁ, M., SCHEINOST, O., ŠTOLBA, P., TRKA, J., VANĚČEK, T., VRTĚL, R.

Frekvenční pohled na vyšetření odchylek genomu.

Časopis lékařů českých, 2006, vol. 145, no. 2, s 98-103. ISSN 0008-7335

MÍRKA, H., FERDA, J., OHLÍDALOVÁ, K., VOKURKA, S., **KARAS, M.**, JINDRA, P., LYSÁK, D., MUKENŠNÁBL, P.

Význam HRCT v diagnostice invazivní plicní aspergilózy u nemocných s hematologickými malignitami.

Česká Radiologie, 2006, vol. 60, no. 6, s. 412-418. ISSN 1210-7883

MÍRKA, H., KASTNER, J., OHLÍDALOVÁ, K., KOUDELOVÁ, J., LYSÁK, D., **KARAS, M.**, MUKENŠNÁBL, P., VESELÁ, P.

Aspergilóza mozku u nemocných s hematologickými malignitami

Česká Radiologie, 2007, vol. 61, no. 3, s. 295-299. ISSN 1210-7883

MÍRKA, H., FERDA, J., OHLÍDALOVÁ, K., JINDRA, P., **KARAS, M.**, LYSÁK, D., VOKURKA, S.

Možnosti HRCT v diagnostice plicní formy chronické reakce štěpu proti hostiteli

Česká Radiologie, 2007, vol. 61, no. 4, s. 387-391. ISSN 1210-7883

HABER, J., RÁČIL, Z., MAYER, J., MALLÁTOVÁ, N., KOUBA, M., SEDLÁČEK, P., FABER, E., HEROLD, I., MÚDRY, P., DRGOŇA, L.,

KOČMANOVÁ, I., **KARAS, M.**, BUCHTA, V., VYDRA, J., KOLÁŘ, M., TRUPL, J., MAREŠOVÁ, V., ROZSYPAL, H., NÝČ, O., CWIERTKA, K.
Léčba invazivní kandidózy – doporučení odborných společností.
Vnitřní lékařství, 2008, vol. 54, no. 12, s. 1174-1184. ISSN 1801-7592

HABER, J., RÁČIL, Z., MAYER, J., MALLÁTOVÁ, N., KOUBA, M., SEDLÁČEK, P., FABER, E., HEROLD, I., MÚDRY, P., DRGOŇA, L., KOČMANOVÁ, I., **KARAS, M.**, BUCHTA, V., VYDRA, J., KOLÁŘ, M., TRUPL, J., MAREŠOVÁ, V., ROZSYPAL, H., NÝČ, O., CWIERTKA, K.
Léčba invazivní aspergilózy – doporučení odborných společností.
Vnitřní lékařství, 2008, vol. 54, no. 12, s. 1187-1194. ISSN 1801-7592

VOKURKA, S., ŠKARDOVÁ, J., MAXOVÁ-KABÁTOVÁ, K., STEINEROVÁ, K., **KARAS, M.**
Mukozitida dutiny ústní po alogenní transplantaci krvetvorných buněk s přípravou fludarabinem a melfalanem FLU/MEL.
Transfúze a hematologie dnes, 2009, vol. 15, no. 1, s. 13-16. ISSN 1213-5763

PEKOVÁ, S., IVANEK, R., DVORAK, M., RUEGGEBERG, S., LEICHT, S., LI, X., FRANZ, T., KOZAK, T., VRBA, J., KOZA, V., **KARAS, M.**, SCHWARZ, J., CETKOVSKY, P., PRUCHA, M.
Molecular variability of FLT3/ITD mutants and their impact on the differentiation program 32D cells: Implications for the biological properties of AML blasts.
Leukemia Research, 2009, vol. 33, no. 10, s. 1409-1416. ISSN 0145-2126. IF 2,358

VOKURKA, S., STEINEROVÁ, K., **KARAS, M.**, KOZA, V.
Characteristics and risk factors of oral mucositis after allogeneic stem cell transplantation with FLU/MEL conditioning regimen in context with BU/CY2.
Bone Marrow Transplantation, 2009, vol. 44, no. 9, s.601-605. ISSN 0268-3369. IF 2,998

VOKURKA, S., KOZA, V., JINDRA, P., **KARAS, M.**, STEINEROVÁ, K., LYSÁK, D., SCHÜTZOVÁ, M., SVOBODA, T., VOZOBULOVÁ, V., ŠVOJGROVÁ, M., MOHAMMADOVÁ, L., JUNGOVÁ, A., HRABĚTOVÁ, M.
Alogenní transplantace krvetvorných buněk u pacientů s mnohočetným myelomem – zkušenosti centra.
Transfúze a hematologie dnes, 2009, vol. 15, no. 4, s. 244-250. ISSN 1213-5763

VOKURKA, S., KOZA, V., LYSÁK, D., **KARAS, M.**, DVORAK, P., JINDRA, P., HRABĚTOVÁ, M., VOZOBULOVÁ, V.
Successful peripheral blood stem cells collection in imatinib pretreated and nilotinib-treated chronic myeloid leukemia patient.
Journal of Oncology, 2010, 2010: 460859. ISSN 1687-8469. IF 2,04

ŠTASTNÝ, M., MACHOVÁ POLÁKOVÁ, K., KLAMOVI, H., ŽÁČKOVÁ, D., VOGLOVÁ, J., **KARAS, M.**, MORAVCOVÁ, J., FABER, E.

Analýza mutací BCR-ABL u CML pacientů rezistentních k imatinibu umožňuje poskytnout „terapii šitou na míru“.

Transfúze a hematologie dnes, 2010, vol. 16, no. 1, s. 47-54. ISSN 1213-5763

VOKURKA, S., SKARDOVA, J., **KARAS, M.**, KOSTKOVA, J., STEINEROVA, K., KOZA, V., BYSTRICKA, E.

Oropharyngeal Mucositis Pain Treatment with Transdermal Buprenorphine in Patients After Alogeneic Stem Cell Transplantation.

Journal of Pain and Symptom Management, 2010, vol. 39, no. 6, s. e4-e6. ISSN 1873-6513. IF 2,64

KARAS, M.

Komentář ke studii: Léčba dasatinibem u pacientů v chronické fázi chronické myeloidní leukémie s rezistencí, nedostatečnou odpovědí nebo nesnášenlivostí vůči imatinibu vede k rychlé a trvalé cytogenetické odpovědi.

Farmakoterapie, 2010, vol. 6, no. 3, s. 282-285. ISSN 1801-1209

VOKURKA, S., ŠKARDOVÁ, J., **KARAS, M.**, KOSTKOVÁ, J., STEINEROVÁ, K., KOZA V., BYSTRICKÁ, E.

První zkušenosti s léčbou bolesti při orofaryngeální mukozitidě pomocí transdermálního buprenorfinu.

Onkologie, 2010, vol. 4, no. 4, s. 265-268. ISSN 1802-4475

KARAS, M.

Febrilní neutropénie s infiltrátem na plicích a negativním galaktomanem – kasuistika.

Antiinfectives news, 2011, vol. 2, no. 2, s. 18-19. ISSN 1804-4212

KARAS, M.

Akutní myeloidní leukémie u nemocných nad 60 let, možnosti její léčby a potenciální role alogenní transplantace krvetvorných buněk.

Onkologie, 2011, vol. 5, no. 2, s. 91-95. ISSN 1802-4475

PEKOVA, S., MAZAL, O., CMEJLA, R., HARDEKOPF, D., W., PLACHY, R., ZEJSKOVA, L., HAUGVICOVA, R., **KARAS, M.**, KOZAK, T.

A comprehensive study of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of 1287 diagnostic and 1148 follow-up CLL samples.

Leukemia Research, 2011, vol. 35, no. 7, s.889-898. ISSN 0145-2126. IF 2,923

VOKURKA, S., SVOBODA, T., **KARAS, M.**, KOZA, V., JINDRA, P., KAZAKOV, D., BOUDOVA, L.

Significant oral graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation with the FLU/MEL conditioning regimen.

Medical Science Monitor, 2011, vol. 17, no.9, s. 480 – 484. ISSN 1234-1010. IF 1,699

VOKURKA, S., SVOBODA, T., JUNGOVA, A., **KARAS, M.**, KOZA, V.
Oral cryotherapy can significantly reduce oral mucositis but not acute GVHD incidence in Flu/Mel conditioning allo-SCT.
Bone Marrow Transplantation, 2012, vol. 47, no. 5, s. 739-741. ISSN 0268-3369. IF 3,541

KARAS, M.

Komentář ke studii Nilotinib v porovnání s imatinibem u pacientů s nově diagnostikovanou CML v chronické fázi – aktualizované výsledky studie ENESTnd.

Farmakoterapie, 2012, vol. 8, no. 3, s. 345-347. ISSN 1801-1209

KOLÁŘ, M., ADÁMKOVÁ, V., NYČ, O., BOJTÁROVÁ, E., CETKOVSKÝ, P., DRGOŇA, L., GUMAN, T., HABER, J., HORÁKOVÁ, J., **KARAS, M.**, KOČMANOVÁ, I., KOUBA, M., LIGOVÁ, A., MALLÁTOVÁ, N., MÚDRY, P., NOVÁK, J., SEDLÁČEK, P., SEJNOVÁ, D., TÓTHOVÁ, E., ŽÁK, P., ŽIAKOVÁ, B., MAYER, J., RÁČIL, Z.

Screening methicilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus*, vankomycin rezistentních enterokoků a enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz na hematologických odděleních. Doporučení odborníků s podporou CELL.

Postgraduální medicína, 2012, vol. 14, no. 5, s. 34-36. ISSN 2112-4184

KOLÁŘ, M., ADÁMKOVÁ, V., NYČ, O., BOJTÁROVÁ, E., CETKOVSKÝ, P., DRGOŇA, L., GUMAN, T., HABER, J., HORÁKOVÁ, J., **KARAS, M.**, KOČMANOVÁ, I., KOUBA, M., LIGOVÁ, A., MALLÁTOVÁ, N., MÚDRY, P., NOVÁK, J., SEDLÁČEK, P., SEJNOVÁ, D., TÓTHOVÁ, E., ŽÁK, P., ŽIAKOVÁ, B., MAYER, J., RÁČIL, Z. Laboratorní záchyt toxigenních kmenů *Cd* (*clostridium difficile*), epidemiologická opatření a antibiotická léčba CDI (*clostridium difficile* infection) na hematologických odděleních.

Doporučení odborníků s podporou CELL.

Postgraduální medicína, 2012, vol. 14, no. 5, s. 37-39. ISSN 2112-4184

JANČUŠKOVÁ, T., PLACHÝ, R., ŠTIKA, J., KRUTÍLKOVÁ, L., HARDEKOPF, D., W., LIEHR, T., KOSYAKOVÁ, N., ČMEJLA, R., ŽEJŠKOVÁ, L., KOZÁK, T., ŽÁK, P., **KARAS, M.**, PEKOVÁ, S.

Identifikace nových markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií.

Transfúze a hematologie dnes, 2013, vol. 19, no. 1, s. 8-21. ISSN 1213-5763

JINDRA, P., MUŽIK, J., INDRÁK, K., SABTY, F., A., KOZÁK, T., CETKOVSKÝ, P., KOZA, V., **KARAS, M.**, RAIDA, L., SZOTKOWSKI, T.

The outcome of allogeneic HSCT in older AML patients is determined by disease biology and not by the donor type: an analysis of 96 allografted AML patients 50 years from czech acute leukemia clinical register (alert).

Neoplasma, 2013, vol. 60, no. 5, s. 576-583. ISSN 1338-4317. IF 1,64

PACHNER, M., VOKURKA, S., KOZA, V., SVOBODA, T., HRABĚTOVÁ, M., JINDRA, P., LYSÁK, D., VOZOBULOVÁ, V., SCHÜTZOVÁ, M., **KARAS, M.**

Spontánní remise akutní myeloidní leukémie – klinické případy jednoho centra.
Klinická onkologie, 2013, vol. 26, no. 2, s. 140-142. ISSN 1802-5307

KLAMOVA, H., POLAKOVA, K., M., MUZIK, J., RACIL, Z., ZACKOVA, D., STEINEROVA, K., **KARAS, M.**, FABER, E., DEMECKOVA, E., MICHALOVICOVA-SNINSKA, Z., VOGLOVA, J., DEMITROVICOVA, L., MIKUSKOVA, E., TOTHOVA, E., CHUDEJ, J., MARKULJAK, I., CMUNT, E., MORAVCOVA, J., DVORAKOVA, D., MICHALOVA, K., JAROSOVA, M., STASTNA, M., M., CETKOVSKY, P., DUSEK, L., KOZA, V., TRNENY, M., INDRAK, K.

Evaluation of 5-year imatinib treatment of 458 patients with CP-CML in routine clinical practice and prognostic impact of different BCR-ABL cutoff levels.

Cancer Medicine, 2013, vol. 2, no. 2, s. 216-225. ISSN 2045-7634. IF 2,915

PAVLIK, T., JANUSOVA, T., MAYER, J., INDRAK, K., JAROSOVA, M., KLAMOVA, H., ZACKOVA, D., VOGLOVA, J., FABER, E., **KARAS, M.**, MACHOVA-POLAKOVA, K., RACIL, Z., DEMECKOVA, E., DEMITROVICOVA, L., TOTHOVA, E., CHUDEJ, J., MARHULJAK, I., CMUNT, E., KOZAK, T., MUZIK, J., DUSEK, L.

Current survival reliably reflects modern sequential treatment in CML: Correlation with prognostic stratification.

American Journal of Hematology, 2013, vol. 88, no. 9, s. 790-797. ISSN 1096-8652. IF 3,477

JANCUSKOVA, T., PLACHY, R., STIKA, J., ZEMANKOVA, L., HARDEKOPF, D., W., LIEHR, T., KOSYAKOVA, N., CMEJLA, R., ZEJSKOVA, L., KOZAK, T., ZAK, P., ZAVRELOVA, A., HAVLIKOVA, P., **KARAS, M.**, JUNGE, A., RAMENL, CH., PEKOVA, S.

A method to identify new molecular markers for assessing minimal residual disease in acute leukemia patients.

Leukemia Research, 2013, vol. 37, no. 10, s. 1363-1373. ISSN 0145-2126. IF 2,692

DE WREEDE, L., C., WATSON, M., VAN OS, M., MILLIGAN, D., VAN GELDER, M., MICHALLET, M., DREGER, P., DEARDEN, C., E., HOMEWOOD, J., DUPUIS, J., LEPORRIER, M., **KARAS, M.**, CORRONT, B., BAERLOCHER, G., M., HERR, W., CHOQUET, S., NIEDERWIESER, D., W., SUTTON, L., KRÖGER, N., DE WITTE, T., M., SCHETELIG, J.

Improved PFS after autologous stem cell transplantation does not translate into better Quality of Life in CLL: lessons from the randomized EBMT-Intergroup study.

American Journal of Haematology, 2014, vol.89, no. 2, s. 174-180. ISSN 1096-8652. IF 3,798

DVORAK, P., LYSAK, D., VOKURKA, S., **KARAS, M.**, SUBRT, I.
Allogeneic stem cell transplantation can improve outcome of AML patients without complete cytogenetic response after induction and consolidation treatment.

Neoplasma, 2015, vol. 62, no. 1, s. 140-145. ISSN 1338-4317. IF 1,961

BAZARBACHI, A., LABOPIN, M., KHARFAN-DABAHA, M., A., SCHWERDTFEGER, R., VOLIN, L., BOURHIS, J., H., SOCIÉ, G., DAGUINDAU, E., GEDDE-DAHL, T., RAMBALDI, A., **KARAS, M.**, SCHLIMOK, G., BLAISE, D., CHEVALLIER, P., MALARD, F., SCHMID, C., ESTEVE, J., NAGLER, A., MOHTY, M.

Allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia with normal karyotype and isolated Nucleophosmin-1 (NPM1) mutation: outcome strongly correlates with disease status.

Haematologica, 2016, vol.101, no. 1, s. e34-7. doi: 10.3324/haematol.2015.135681. Epub 2015 Sep 24. ISSN 1592-8721. IF 6,671

ZEMANOVÁ, K., ŽIŽKOVÁ, H., JURČEK, T., DVOŘÁKOVÁ, D., ZACH, J., POLÍVKOVÁ, V., VLČANOVÁ, K., DIVOKÁ, M., KŘUPKOVÁ, L., HROCHOVÁ, K., **KARAS, M.**, MACHOVÁ-POLÁKOVÁ, K.

Chronická myeloidní leukémie – standardizace molekulárního monitorování hladiny transkriptů BCR-ABL1 v České republice.

Transfúze a hematologie dnes, 2016, vol. 22, no. 1, s. 56-64. ISSN 1213-5763

JINDRA, P., RAIDA, L., LYSAK, D., **KARAS, M.**, PAPAŽIK, T., JUNGOVA, A., MOHAMMADOVA, L., HOUDOVA, L.

Prognostic factors to predicts outcome of reduced intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia

Neoplasma, 2016, vol. 63, no. 4, s. 595-600. ISSN 1338-4317. IF 1,961

KREJČÍ, M., SEDLÁČEK, P., JINDRA, P., ŠŤASTNÁ-MARKOVÁ, M., FABER, E., ŽÁK, P., TRNĚNÝ, M., KOZÁK, T., ŠTĚRBA, J., HÁJEK, R., BÜCHLER, T., KUŘÍKOVÁ, M., MAYER, J., STARÝ, J., **KARAS, M.**, VÍTEK, A., RAIDA, L., POHLREICH, D., KOŘÍSTEK, Z., CETKOVSKÝ P.
Indikace k alogenním a autologním transplantacím krvetvorných buněk v ČR v roce 2016: doporučení transplantální sekce české hematologické společnosti ČLS a české onkologické společnosti ČLS JEP.

Transfúze a Hematologie dnes. 2016; 22(2): 127-150. ISSN 1213-5763

KARAS, M., STEINEROVA, K., LYSAK, D., HRABETOVA, M., JUNGOVA, A., SRAMEK, J., JINDRA, P., POLIVKA, J., HOLUBEC, L.

Pre-transplant Quantitative determinativ of NPM1 Mutation Significantly Predicts outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem cell transplantation in Patients with Normal karyotype AML in Complete Remission.

Anticancer Research, 2016, vol. 36, no. 10, s. 5487-5498. ISSN 0250-7005. IF 1,895

9.2 Vybraná abstrakta přednášek a posterů publikovaná v periodících

Karas M, Jindra P, Koza V, Polívková M, Konstantinovičová M.

Monitorace FLT3/ITD u nemocných s AML.

Sborník abstrakt-Olomoucké hematologické dni se zahraniční účastí, 4.-7.6.2003, s 59

Karas M, Jindra P, Koza V, Černá K, Škopek P, Vokurka S, Lysák D, Švojgrová M, Vozobulová V, Schützová M.

Alogenní transplantace po redukované přípravě u nemocných s AML mimo 1.CR – zkušenosti HOO FN Plzeň.

Sborník abstrakt-Olomoucké hematologické dni se zahraniční účastí, 2.-5.6.2004, s 45

Karas M, Koza V, Jindra P, Steinerová K, Lysák D, Vokurka S, Vozobulová V, Schützová M., Svoboda T.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk po redukované přípravě může zlepšit prognózu vysocerizikové AML u starších nebo jinak vážně nemocných pacientů.

Sborník abstrakt-Olomoucké hematologické dni se zahraniční účastí, 15.-18.6.2005, s 51

Karas M, Koza V, Steinerová K, Jindra P, Svoboda T.

Alogenní transplantace po redukované přípravě u AML mimo kompletní remisi – potenciaální vliv časného ukončení imunosuprese

Vnitřní lékařství 2008; 54: 30.

(Sborník abstrakt-XXII.Olomoucké hematologické dni s mezinárodní účastí, 28.5.-30.5.2007)

Karas M, Steinerová K, Jindra P, Lysák D, Svoboda T, Vokurka S, Mohammed L, Vozobulová V, Hrabětová M, Koza V.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk u nemocných s akutní myeloidní leukémií se středním cytogenetickým rizikem v 1.kompletní remisi – analýza výsledků jednoho centra v období 2003-2008.

Transfuze a hematologie dnes 2009; 15: 8.

XXIII.Olomoucké hematologické dni s mezinárodní účastí, 24.6.-26.6.2009

Karas M., Steinerova K., Jindra P., Lysak D., Svoboda T., Vokurka S., Koza V.: Comparable outcome of unrelated and related haematopoietic stem cell transplantation for intermediate-risk acute myeloid leukemia – a single centre analysis. 37th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Paris, France, 3.– 6.4.2011, Bone Marrow Transplant 2011; 46, Suppl.1: 279-280.

Karas M., Svoboda T, Steinerová K., Jindra P, Lysák D., Vokurka S., Koza V.: Reduced-intensity transplantation as part of standard treatment strategy in patients aged 60 to 70 years with acute myeloid leukaemia – single-centre experience.

Sborník abstrakt: XVI.česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd, 5.-8.září 2012:s 77.

Andersen NS, Vindelov L, **Karas M**, Gramatzki M, Machaczka M, Vitek A, Stadler M, Dreger P, Faber E, Montserrat E, Socie G, Michallet, Moreno, Niederwieser D, Bornhäuser M, Nenseler A, Wreede, Geodet M, Kröger, Schetelig J. The effect of non-myeloablative (NMA) versus reduced-intensity conditioning (RIC) in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) undergoing allogeneic haematopoietic cell transplantation (allo-HCT): a retrospective EBMT analysis.

39th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, London, Great Britain, 7.– 10.4.2013
Bone Marrow Transplant 2013; 48, Suppl.2: 16.

Karas M., Steinerová K., Svoboda T., Lysák D., Vokurka S., Vozobulová V., Schützová M., Jindra P. Alogenní transplantace krvetvorných buněk po redukované přípravě fludarabinem a melfalanem u AML mimo kompletní remisi – 10 leté zkušenosti jednoho centra.

Sborník abstrakt: XXVII.Olomoucké hematologické dni, 12.5.-14.5.2013:s 26

Gelder M., Wreede L, Henseler A., Biezen A., Niederwieser D., **Karas M.**, Andersen NS., Gramatzki M., Dreger P., Bunjes D., Petersen E., Potter M., Beelen D., Yacoub-Agha I, Cornelissen JJ., Russell NH., Finke J., Maertens J., Blaise D., Paneesha S., Vitek A., Bornhäuser M., Schoenland S., Kröger N., Schetelig J.: Long-term follow-up data support curative potential of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia: a retrospective analysis from the chronic malignancies working party of the EBMT. 40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Milan, Italy, 30.3.– 2.4.2014, Bone Marrow Transplantation 2014; 49, Suppl.1:34

Karas M., Steinerová K., Lysák D., Vokurka S., Hrabětová M., Jindra P. Pre-transplant quantitative monitoring of NPM1 mutations significantly predicts outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in normal karyotype AML in complete remission

Sborník abstrakt: XXIX.Olomoucké hematologické dni, 31.5.-2.6.2015: s 44

Karas M., Steinerová K., Vozobulová V., Hrabětová M., Lysák D., Jindra P. Reduced-intensity transplantation (RIT) in patients with high-risk or advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL) in period 2011-2015. Decrease transplant-related mortality (TRM) improves treatment results – single centre experience

Transfuze a hematologie dnes 2016; 22: 57.

XXX.Olomoucké hematologické dni s mezinárodní účastí, 29.5.-31.5.2016

Karas M., Steinerová K., Hrabětová M., Pachner M., Jungová A., Lysák D., Jindra P.

Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in normal karyotype AML with NPM1 mutation in complete remission is not affected by FLT3/ITD positivity – potentially crucial importance of pre-transplant level of minimal residual disease

Transfuzní a hematologické dnes 2016; 22: 58.

XXX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 29.5.-31.5.2016